

**Histotopochemische und quantitativ-
histochemische Untersuchungen über das
Verhalten der alkalischen und sauren
Phosphatasen an der normalen und durch
Tetrachlorkohlenstoff und Sublimat
geschädigten Leber und Niere der Ratte**

Hauke Krey

=
1964

Aus dem Pathologischen Institut der Universität
Frankfurt am Main.

Direktor: Prof. Dr.med. Rotter

Histotopochemische und quantitativ-histochemische
Untersuchungen über das Verhalten der alkalischen
und sauren Phosphatasen an der normalen und durch
Tetrachlorkohlenstoff und Sublimat geschädigten
Leber und Niere der Ratte.

Inaugural-Dissertation
zur

Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

vorgelegt von
Hauke Krey
aus Fulda

Frankfurt am Main 1964

Dekan : Professor Dr. H. Frick
Referent : Professor Dr. H. Zimmermann
Korreferent : Professor Dr. Wacker
Mündliche Prüfung : 23. Dezember 1964



G l i e d e r u n g .

- I. Einleitung.
- II. Die Phosphatesterasen.
- III. Die histochemischen Methoden zur Darstellung der Phosphomonoesterasen.
- IV. Eigene Untersuchungen.
 - A. Untersuchungsmaterial und Methoden.
 - B. Befunde.
 - 1. Die normale Aktivität der Phosphatasen in der Rattenleber und Rattenniere.
 - 2. Histochemische Befunde an der normalen Rattenleber und Rattenniere.
 - 3. Untersuchungen unter experimentellen Bedingungen.
 - a) Versuche mit Tetrachlorkohlenstoff.
 - b) Versuche mit Sublimat.
 - C. Diskussion.
- V. Zusammenfassung.
- VI. Schrifttum.
- VII. Abbildungen.

I. E i n l e i t u n g.

Es ist üblich, ein "normal" erscheinendes histologisches Präparat als Äquivalentbild einer ungestörten Organfunktion zu werten. Die Histochemie führt uns einen Schritt weiter und zeigt uns durch eine Farbreaktion ein Glied aus dem Zellstoffwechsel.

In der vorliegenden Arbeit versuchten wir, die Aktivität der alkalischen und sauren Phosphatasen in Leber und Niere der Ratte durch bewährte histochemische Methoden optimal darzustellen und dieselben Methoden zur Grundlage einer quantitativen Aktivitätsbestimmung dieser Enzyme zu machen. Gleichzeitig wollten wir unser photometrisches Aceton-Extraktionsverfahren unter experimentopathologischen Bedingungen erproben und unsere histochemischen Beobachtungen durch quantitative Aussagen stützen.

II. Die Phosphatesterasen.

Anorganische und organische Phosphatverbindungen kommen in allen tierischen und pflanzlichen Zellen vor und spielen eine überragende Rolle im intermediären Stoffumsatz der Organismen. Im Kohlenhydrat-, Eiweiß- und Lipidstoffwechsel sind Phosphatester Endprodukte oder Zwischenstufen. Der tierische und pflanzliche Organismus ist in der Lage, Energie in Phosphatverbindungen zu speichern und bei Bedarf die gespeicherten Energien freizusetzen.

Synthese und Abbau der Phosphatester werden durch Fermente, die sogenannten Phosphatasen, katalysiert. Einzelheiten über den Wirkungsmechanismus der Phosphatasen im intermediären Stoffwechsel sind nicht bekannt, man weiß aber, daß der alkalischen Phosphatase eine entscheidende Bedeutung bei der Verknöcherung zukommt, und daß die alkalische Phosphatase der Nierentubuli die Rückresorption der Monosaccharide steuert (Ammon und Dirscherl 1959; Richterich 1958).

Man hat versucht in die zunächst verwirrende Vielfalt der phosphatspaltenden Enzyme ein System zu bringen. Wir unterscheiden nach der Substratspezifität

1. Phosphomonoesterasen
2. Phosphodiesterasen und
3. Phosphopolyesterasen

und tragen damit dem Verhalten dieser Fermente gegenüber der Länge der Phosphatkette Rechnung. (Ammon und Dirscherl 1959). Wichtig für unsere histochemischen Untersuchungen ist die Einteilung in

- a) saure Phosphatesterasen und
- b) alkalische Phosphatesterasen.

In vitro zeigen die Fermente charakteristische Reaktionsoptima bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen, die sauren Phosphatasen bei pH 3 - 5, die alkalische bei pH 9-10. Den Histochemiker interessieren besonders die Phosphomonoesterasen, zu deren histotopochemischen Darstellung eine Reihe guter Methoden zur Verfügung stehen. Die geringe Substratspezifität erlaubt den Gebrauch unphysiologischer Substrate in vitro.

Die saure Phosphatase.

Den höchsten Gehalt an saurer Phosphatase zeigt beim Menschen und bei höheren Säugetieren die Prostata, daneben kommt das Ferment auch in der Leber, in der Niere und in der Milz reichlich vor. Die saure Phosphatase besteht wahrscheinlich aus drei Fraktionen, die sich durch ihre pH-Optima, durch ihre Spezifität und ihre Empfindlichkeit gegenüber hemmenden und aktivierenden Ionen unterscheiden (Lit. bei Ammon und Dirscherl 1959). Die Rattenleber enthält zwei, vielleicht auch drei saure Phosphatasen in verschiedener Lokalisation (Burstone 1958 und 1961; Barka 1961).

Die alkalische Phosphatase.

Die alkalische Phosphatase wird beim Menschen wahrscheinlich zum Großteil in den Osteoblasten gebildet, an das Serum abgegeben und durch die Leber in die Galle ausgeschieden. Die Galle des Menschen und höherer Säugetiere enthält das Ferment in aktiver Form (Lit. bei Richterich 1958; bei Ammon und Dirscherl 1959; bei Popper und Schaffner 1961).

III. Die histochemischen Methoden zur Darstellung der Phosphomonoesterasen.

Die Methode nach Gomori und Takamatsu.

Im Jahre 1959 gaben unabhängig voneinander Gomori in Amerika und Takamatsu in Japan eine Methode an, mit deren Hilfe es möglich war, die Aktivität der Phosphatesterasen im Gewebe sichtbar zu machen und in der Zelle zu lokalisieren.

Prinzip der Methode:

Das durch die Enzyme im Gewebe abgespaltene Phosphat wird ausgefällt und in eine stark gefärbte Verbindung überführt.

Darstellung der alkalischen Phosphatase:

Na- α -Glyzerophosphat wird im Gewebe hydrolysiert, das abgespaltene Phosphat durch Calcium-Ionen, die in der Inkubationslösung anwesend sind, in unlöslichen Calciumphosphat umgewandelt, welches durch einen Zusatz von Ammoniumsulfid in schwarzen Calciumsulfid überführt wird. Gomori veränderte später die Methode, indem er nicht Calcium- sondern Kobaltionen (Kobaltnitrat) der Inkubationslösung zusetzte, das präzipitierte Kobaltphosphat mit Ammoniumsulfid schwärzte und dadurch bessere Ergebnisse erzielte. Der Niederschlag des Calcium- oder Kobaltsulfids ist fein dispers, diffundiert kaum in die Umgebung und ist wasserunlöslich. Er ist auch an Stellen schwacher Fermentaktivität noch deutlich sichtbar. Die in Gomori-Präparaten bisweilen zu beobachtende Schwarzfärbung der Kerne, die nach biochemischen Untersuchungen wenig oder keine Phosphatasen enthalten sollen, wurde später von Gomori selbst als sekundäre Adsorption des Calciumphosphates an die Kernmembran erkannt. Kobaltphosphat zeigt diese Eigenschaft weniger und entsprechend auch keine oder höchstens geringe Anfarbung der Zellkerne.

Darstellung der sauren Phosphatase:

Gomori benutzte ebenfalls Na-Glyzerophosphat, dessen abgespaltener Phosphatrest durch Kobaltnitrat ausgefällt, durch Bleinitrat in Bleiphosphat umgewandelt und mit Ammoniumsulfid geschwärzt wurde.

Die Azo-Farbstoffmethoden.

Im Jahre 1944 entwickelten Menten, Junge und Green ein Verfahren, das zur Darstellung der alkalischen Phosphatase nicht wie bei der Gomori'schen Methode auf der Sichtbarmachung des abgespaltenen Phosphatrestes, sondern auf einer Ausfällung der alkoholischen Komponente des Substratmoleküls beruhte.

Prinzip der Methode:

Das Substrat, ein Aryl- oder Alkylester, wird durch die hydrolytische Aktivität der Fermente gespalten, der Alkyl- bzw. Arylrest wird durch die Abspaltung des Phosphates für Diazoniumsalze kupplungsfähig gemacht und kann somit eine Azokupplung eingehen. Am Ort der Fermentreaktion entstehen je nach Substrat und Diazonium-Komponente Azo-Farbstoffe in brillanten Farbtönen.

Darstellung der alkalischen Phosphatase:

In ihrem Originalverfahren verwendeten Menten, Junge und Green (1944) Calcium- α -Naphthylphosphat und als Diazonium-Komponente zur Azokupplung des freiwerdenden α -Naphthols frisch diazotiertes α -Naphthylamin. Sie inkubierten bei pH 9,4; der entstandene Azo-Farbstoff war leuchtend rot. Alle später angegebenen Simultankupplungsverfahren unter Verwendung von Diazoniumsalzen beruhen auf dem Prinzip von Menten, Junge und Green.

Die Methode wurde mannigfach geändert und verbessert im Hinblick auf die chemische Eignung verschiedener Substrate und Diazonium-Komponente (Belligman und Manheimer 1949; Gomori 1951; Friedmann und Belligman 1950; Pearse 1953).

Darstellung der sauren Phosphatase:

Belligman und Manheimer entwickelten 1949 ein Verfahren zur Darstellung der sauren Phosphatase. Prinzipiell beruht es auf der histochemischen Darstellung eines fermentativ freigesetzten Arylrestes durch Azokupplung (Idee der Menten-Junge-Green-Methode). Manheimer und Belligman fanden, daß β -Naphthylphosphat bei sauren pH-Werten schneller hydrolysiert wird als entsprechende α -Stereoisomere und empfahlen deshalb zur Darstellung der sauren Phosphatase β -Naphthylphosphat-Na als geeignetes Substrat. Als Diazoniumkomponente benutzten sie in ihrem Originalverfahren frisch diazotiertes Anthrachinon-1-diazoniumchlorid. Änderungen und Verbesserungen fand das Manheimer-Belligman-Ver-

fahren besonders durch Grogg und Pearse (1952).

Da sich die vorliegende Arbeit besonders mit der Anwendung der Diazoniummethoden beschäftigt, soll auf Einzelheiten noch näher eingegangen werden.

Chemische Grundlagen der Diazoniummethoden.

Bei diesen histochemischen Verfahren stehen uns zwei wesentliche Techniken zur Verfügung. Einmal das Simultankupplungsverfahren, bei dem Substrat und Diazoniumkomponente gleichzeitig im Inkubationsmedium gelöst sind, auf der anderen Seite die Succedaneumethode, bei der die Schnitte zuerst in der Substratlösung inkubiert und anschließend in einem zweiten Bad der Azokupplung zugeführt werden (Pearse 1960). Wir ziehen die Simultankupplungsmethode vor, die sich besonders zur Darstellung der Phosphatesterasen durchgesetzt hat.

Die Diazoniumkomponente.

Bei der Auswahl der Diazoniumkomponente liegt uns an einem schnell kuppelndem Material, das den abgespaltenen Arylrest bindet und unlöslich macht, bevor eine Diffusion in die Umgebung stattfindet. Es stehen uns Diazoniumsalze mit unterschiedlicher "Kupplungsenergie" zur Verfügung (Pearse, Gössner); hohe Kupplungsenergiewerte bedeuten große Reaktionsbereitschaft und dadurch schnelle und totale Azo-Kupplung, an der uns gelegen ist. Je schneller das enzymatische Spaltungsprodukt (primäres Reaktionsprodukt) abgefangen wird, um so weniger Artefakte sind zu erwarten. Diazoniumsalze sind chemisch labile Verbindungen. Die im Handel erhältlichen Farbesalze enthalten sogenannte Stellmittel, mit deren Hilfe der Anteil an diazotierter Base auf ein festes Quantum eingestellt und eine gewisse Stabilität erreicht wird (Gössner 1958). Aluminiumsulfat, Zinksulfat, Magnesiumsulfat, Kochsalz und Glaubersalz, die als Stellmittel Verwendung finden, beeinträchtigen die Fermente in ihrer Funktion in unkontrollierbarer Weise. Zu hohe Diazoniumsalzkonzentrationen hemmen die Fermente; 1-2 mg/ml Inkubationslösung haben sich als optimal erwiesen (Pearse, Gössner 1958).

Die Naphtolverbindungen.

Die in früheren Arbeiten von Seligman und Manheimer empfohlenen β -Naphtole und deren Derivate kuppeln langsam und können deshalb zu erheblichen Artefakten führen, wenn sie auch brillante Azo-Farbstoffe bilden (Gomori 1952, Pearse 1953). Seligman und Manheimer erprobten später α -Naphtole und deren Derivate, die kupplungsfreudiger sind und damit Lokalisationstreue garantieren.

Naphtole der AS-Reihe.

Arylamide aromatischer Hydroxyssäuren, besonders die der 2-3-Hydroxynaphtoesäure, die Naphtole der AS-Reihe, sind in der Histochemie der Esterasen wegen ihrer Lokalisationstreue gut geeignet (Burstow 1958, Barka 1961 u. a.). Die Verlängerung des Systems konjugierter Doppelbindungen im Molekül der AS-Derivate durch Einführung der -CONH-Gruppe erzeugt eine gesteigerte Substantivität der Substrate und damit eine gewisse Bindung an Gewebeproteine und geringere Diffusion (Pearse 1960).

Die hier besprochenen Substrate kommen zwar nicht im intermediären Stoffwechsel der Organismen vor, die bekannt geringe Substratspezifität der Phosphatesterasen berechtigt uns aber zu der Annahme, daß sich diese Fermente gegenüber den von uns angebotenen Substraten ebenso verhalten wie gegenüber den natürlichen. Einige Naphtolverbindungen zeigen in wässriger Lösung spontane Hydrolyse, was bei kurzen Inkubationszeiten allerdings keine Rolle spielt.

Bei der Auswahl aus der Fülle von Farbstoffen und Substraten, die uns zur histochemischen Darstellung der alkalischen und sauren Phosphatasen zur Verfügung standen, lag uns an Substanzen, die sowohl gute histochemische Resultate zeigen, als sich auch für unser quantitatives Verfahren eignen. Wir verwendeten zur Darstellung der alkalischen Phosphatase von Leber und Niere der Ratte

als Substrat: Naphtol-AS-Ts-phosphat

und als Diazonium-Komponente: Variaminblausalz B.

Für die saure Phosphatase der Leber und Niere eignete sich gut

als Substrat: Na- β -Naphthylphosphat

und als Diazonium-Komponente: Fast Garnet GBC Salt.

IV. E i g e n e U n t e r s u c h u n g e n.

A. Untersuchungsmaterial und Methoden.

Wir verwendeten weibliche wistar-Ratten mit einem Gewicht zwischen 250 und 350 g; Tötung durch Nackenschlag und Entbluten. Das Abdomen eröffneten wir sofort, entnahmen das Gewebe lebensfrisch und überführten es in 2-3mm dicken Scheiben in die Fixationslösung.

Fixationslösung (Pearse):

300ml 40% Formaldehyd

16 g NaCl

ad 2000 ml aqua dest.

Das Gewebe blieb 24 Stunden zur Fixation bei 4 C im Kühlschrank. Die Gefriermikrotomschnitten (10 μ) spülten wir kurz in Pufferlösung ab und brachten sie in die Inkubationslösung ein.

Ansetzen der Inkubationslösung:

Es empfiehlt sich, die Inkubationslösung vor jeder Färbung frisch anzusetzen, da die dazu verwendeten Diazoniumsalze in wässriger Lösung instabil sind.

Inkubationslösung zur Darstellung der alkalischen Phosphatase::

Substrat und Diazoniumsalz werden nacheinander in einer Konzentration von jeweils 1mg Substanz / 1ml Tris-Pufferlösung (pH 10) aufgelöst. Die Schnitte werden aus dem Puffer-Bad mit einem Glashäkchen in die Inkubationslösung eingebracht. Um ein gleichmäßiges Durchtränken der Schnitte mit der Inkubationslösung zu gewährleisten, müssen die Gefäße, in der die Inkubation erfolgt, laufend in Bewegung gehalten werden. Wir bedienten uns hierzu eines magnetischen Rührers, der die in einem großen Glasgefäß schwimmenden Inkubationsgefäße laufend langsam rotieren ließ und dadurch die Schnitte in Bewegung hielt. Die Inkubation muß wegen der Lichtempfindlichkeit der Diazoniumsalze im Dunkeln erfolgen, besonders wenn, wie in unserem Falle, auf eine quantitative Bestimmung der Fermentaktivität Wert gelegt wird.

Der Gehalt an alkalischer Phosphatase in der Leber ist gering. Deshalb muß die Inkubation entsprechend lange erfolgen, um die vorhandenen Fermentaktivitäten ausreichend sichtbar zu machen. Die Inkubationsdauer zur Darstellung der alkalischen Leberphosphatase betrug in unserem Falle 90 Minuten. Die Inkubationslösung wurde dabei nach 45 Minuten durch frische ersetzt, da die Zerstörung des Diazoniumsalzes Variaminblausalz B in wässriger Lösung auch bei Dunkelheit bereits nach etwa 1 Stunde einsetzt. Wir beendeten die Inkubation, indem wir die Schnitte mit Glashäkchen aus der Inkubationslösung in ein Wasserbad einbrachten, das mehrmals gewechselt wurde, bis die diffuse grüngelbliche Anfärbung des Leberparenchyms durch die Inkubationslösung verschwand. Die Schnitte verblieben dann noch etwa 10 bis 15 Stunden im Wasserbad, um dann der quantitativen Fermentbestimmung, die unten beschrieben werden soll, zugeführt zu werden.

Die Aktivität der alkalischen Phosphatase in der Niere ist größer und gestattet deshalb die kurze Inkubationszeit von 5 Minuten.

Ansetzen der Inkubationslösung für die saure Phosphatase: Substrat und Farbstoff lösten wir in Konzentrationsverhältnissen wie bei der alkalischen Phosphatase, nämlich jeweils 1mg Diazoniumsalz und 1mg Substrat / 1ml Pufferlösung, hier Acetatpuffer von pH 5. Wir inkubierten die Leberschnitte 25 Minuten, ebenfalls im Dunkeln und in beweglichen Inkubationsgefäßen. Die Nierenschnitte inkubierten wir 20 Minuten. Auch hier wurde die Inkubation durch mehrfach gewechseltes Wasserbad beendet.

U n s e r V e r f a h r e n z u r q u a n t i - t a t i v e n E r m i t t l u n g d e r F e r m e n t a k t i v i t ä t .

Prinzip der Methode:

Wie durch die Phosphatasenreaktion mit einem wasserunlöslichen Farbstoff beladenen, jeweils 30 Gewebsschnitte von 10µ Dicke schüttelten wir mit je 20ccm Aceton aus. Aceton löst den Azo-Farbstoff quantitativ aus dem Gewebe. Andere Lösungsmittel, wie z.B. Alkohole, Ather, Benzol, Glyzerin, Tetrachlorkohlenstoff und Schwefelkohlenstoff eigneten sich zur Farbstoffreaktion nicht gut. Das von Lojda angegebene Dioxan und ebenso das von

Pugh und Walker angegebene Athylacetat eigneten sich zur wirklich quantitativen Eliminierung des Farbstoffes nicht so gut wie Aceton.

Um eine Verdunstung zu vermeiden, arbeiteten wir grundsätzlich nur mit kaltem Aceton. Der Farbstoff löst sich nach wenigen Sekunden aus dem Gewebe heraus. Nach der Extraktion entfernten wir das Gewebe aus dem Acetonbad und bestimmten das genaue Gewicht auf der Analysenwaage. Je nach Fermentaktivität bzw. je nach Menge des durch die Fermentaktivität im Gewebe gebildeten Farbstoffes erhalten wir so verschieden intensive Farblösungen und sind in der Lage, die Farbstoffkonzentration als direktes Äquivalent der Enzymwirkung im Spektralphotometer quantitativ zu erfassen. Wir ermittelten das Extinktions-Maximum der Wellenlängenverteilungskurven, bei der immer wieder die Extinktion bestimmt wurde. Der Azo-Farbstoff aus Variaminblausalz B und Naphthol AS-TM zeigte ein Extinktions-Maximum bei 590 nm. Für den bei der Reaktion der sauren Phosphatase entstandenen Farbstoff aus Fast Garnet GBC und α -Naphtholphosphat ermittelten wir eine maximale Extinktion bei 559 nm. Die Extinktionen bezogen wir jeweils auf 1mg extrahiertes Gewebe.

Farbstoffgewinnung für die Eichwerte.

Um Aussagen über die Farbstoffmengen, die durch die fermentativ ermöglichte Azo-Kupplung im Gewebe entstehen, machen zu können, stellten wir die Farbstoffe in Pulverform her. Dazu extrahierten wir eine größere Anzahl Schnitte mit Aceton, dampften ein und erhielten reinen Farbstoff, der nun in Gewichtseinheiten gelöst und photometrisch erfasst wurde.

Dabei zeigte 1mg des Kupplungsproduktes aus Variaminblausalz B / Naphthol AS-TM eine Extinktion von 0,9

1mg des Kupplungsproduktes aus Fast Garnet GBC / Naphthol-Na eine Extinktion von 0,197.

So war es möglich, aus den Extinktionen auf die Farbstoffmenge zu schließen.

B. Befunde.

1. Die normale Aktivität der Phosphatasen in Katzenleber und Rattenleber, gemessen an der Menge des gebildeten Farbstoffes.

Die angegebenen Farbstoffmengen sind Mittelwerte aus zwanzig normalen Ratten und geben an, wieviel mg Azo-Farbstoff von einem mg Gewebe während der oben genannten Inkubationszeiten gebildet werden.

a) alkalische Leberphosphatase:	0, 120 mg
Streuung:	0, 153 mg bis 0, 092 mg
b) alkalische Nierenphosphatase:	1, 59 mg
Streuung:	2, 13 mg bis 0, 96 mg
c) saure Leberphosphatase:	0, 269 mg
Streuung:	0, 345 mg bis 0, 218 mg
d) saure Nierenphosphatase:	0, 280 mg
Streuung:	0, 470 mg bis 0, 156 mg

Die quantitativen Befunde der alkalischen Nierenphosphatase erscheinen sehr hoch, wurden aber durch Wägen einzelner Schnitte vor und nach der Inkubation verifiziert.

2. Histochemische Befunde an der normalen Katzenleber und Rattenleber.

Lokalisation der alkalischen Leberphosphatase (Abb. 1 und 2):

Schon bei schwacher Vergrößerung erkennt man die Bevorzugung der peripheren Läppchenanteile, besonders in der Umgebung der Glissonschen Felder. Deutlich angefarbt sind die Lichtungen der kleinen Gallekapillaren, und vereinzelt ist in den Sinusoidwänden ein feingranulärer Farbstoffniederschlag sichtbar. Die Adventitia der Lobulären Arterien und Venen in den Glissonschen Feldern, ebenso die Epithelien der Gallengänge zeigen eine deutlich positive Reaktion (Lit. bei Popper 1961).

Lokalisation der a l k a l i s c h e n N i e r e n p h o s -
p h a t a s e (Abb. 3 und 4):

Bei der Betrachtung mit schwacher Vergrößerung fällt sofort die starke Reaktion in der Nierenrinde und demgegenüber die weitgehend farblose Markzone und farblose Nierenpapille auf. Die äußere Rinde ist stark positiv, die mittlere Rindenzone etwas schwächer, die innere aber am stärksten angefärbt. Die Kapillarmembranen der Glomerulumschlingen sind nur vereinzelt positiv und heben sich deutlich von den umgebenden stark positiven Tubulusanteilen ab. Bei stärkerer Vergrößerung erkennt man den Farbstoffniederschlag besonders in den lichtungnahen Anteilen der Tubuli bzw. in den Bürstensäumen der Hauptstücke. Die übrigen Zellanteile der Hauptstückepithelien und die Zellkerne sind völlig frei von Farbstoff. Vereinzelt positive Reaktion auch in den lichtungnahen Anteilen der Mittelstückepithelien. Die Adventitia der Arteriae arcuatae sowie die Gefäßwände der kleinen Nierenbeckengefäße sind ebenfalls phosphatasepositiv. Die Papille ist enzymnegativ.

Lokalisation der s a u r e n L e b e r p h o s p h a t a s e
(Abb. 5):

Das Leberparenchym zeigt eine intrazytoplasmatische und peribiliäre Phosphatasereaktion mit besonderer Betonung der Läppchenperipherie. Manchmal zeigt die Umgebung der Zellkerne eine besonders deutliche Anfärbung, die Zellkerne selbst sind enzymnegativ, Bindegewebe, Gefäßwände und Gallengangsepithelien in den Glissonschen Feldern zeigen eine schwach positive Reaktion.

Lokalisation der s a u r e n N i e r e n p h o s p h a t a s e
(abb. 6):

Alle Elemente des Nephron zeigen bei der Darstellung der sauren Phosphatase einen positiven Befund, wenn auch die funktionell verschiedenen Tubulusabschnitte unterschiedliche Aktivität aufweisen. Vor allem ist das Zytoplasma und da wiederum der basale Zellanteil stark angefärbt. In der Rinde sind die Zellen der proximalen und der distalen Tubuli contorti stark und die Bürstensäume deutlich angefärbt. Die Glomerula sind schwach positiv, die Zellkerne im Organ frei von Farbstoff. In der äußeren Markzone sind die Epithelien der gestreckten Anteile der proximalen Tubuli contorti und der aufsteigende Schenkel der

Henleschen Schleife positiv. Die dünnen Anteile der aufsteigenden Henleschen Schleife sind nur schwach mit Farbstoff beladen, dagegen sind die dicken Anteile und die Epithelien der gestreckten Sammelröhrchen intensiv positiv. Die Sammelrohre in der inneren Markzone sind verschieden stark positiv, die Strecken der Henleschen Schleife sind hier nur schwach gefärbt. Das Übergangsepithel des Nierenbeckens zeigt ebenfalls schwach positive Reaktion.

3. Untersuchungen unter experimentellen Bedingungen.

a) Versuche mit Tetrachlorkohlenstoff (CCl₄).

Versuchsanordnung: Die Tiere wurden täglich einer CCl₄-Inhalation ausgesetzt. Dazu brachten wir 6ml Tetrachlorkohlenstoff in einer Glaskammer mit 40l Inhalt zum Verdampfen und exponierten die Tiere 6 Minuten. In den ersten 2 Minuten verhielten sich die Tiere unauffällig, wurden nach 2-3 Minuten sichtlich unruhig und fielen nach 3-5 Minuten in eine tiefe Narkose. Anscheinend gewöhnten sich die Tiere im Laufe der Versuchsserie an die Tetrachlorkohlenstoffexposition. Während der letzten Tage nämlich setzte die narkotische Wirkung des CCl₄ nicht wie in den ersten Begasungstagen nach 3-5 Minuten, sondern erst nach 5-5 $\frac{1}{2}$ Minuten ein. Wir untersuchten jeweils 2 Tiere nach 1-10 Begasungen und in den Langzeitenversuchen nach 21, 78, 95, 127 und 150 Begasungen. Die Tötung der Tiere erfolgte 2 Stunden nach der letzten Exposition. Histochemisch untersuchten wir Leber und Nieren auf alkalische und saure Phosphatasen und ergänzten unsere Befunde durch morphologische Untersuchungen mittels H.E., Fett- und Bindegewebs-(van Gilson)-Färbung und der PAS-Färbung.

Morphologische Befunde an der Leber nach 1-10 Begasungen (Kurzzeitversuche).

Das morphologische Bild des Tetrachlorkohlenstoffschadens an der Leber ist aus der Literatur hinreichend bekannt und soll deswegen auch nur gestreift werden.

Geringe morphologische Veränderungen sind schon nach einer Begasung an der Leber feststellbar. Ganz vereinzelt sieht man hydropisch gequollene Zellen mit aufgehelltem Zytoplasma, vorwiegend in der Umgebung der Zentralvene gelegen. Nach 3-4 Begasungen ist der Befund deutlicher: ein breiter, in seinem Durchmesser etwa $\frac{1}{4}$ des Läppchens einnehmender Ring um die Zentralvene ist aufgehellte, das Zytoplasma körnig und schollig, stellenweise Kernzerfall, das Läppchenzentrum wird nekrotisch. Nach 7-8 Begasungen finden sich neben ausgedehnten zentralen

Nekrosen derartig hydropisch geschädigte Parenchymzellen über das ganze Läppchen verteilt. Vereinzelt kommt es zu einer geringen Sternzellenwucherung. Nach 8-9 Tagen bilden sich zwischen den nekrotischen Zentren "Straßen" aufgehellter, hydropisch gequollener Zellen. Von Zentrum zu Zentrum zieht sich ein Netz aufgehellter Zellen. Nach 9-10 Begasungen sieht man hier und da zarte Bindegewebelemente in den nekrotischen Bezirken. Das Sudanpräparat zeigt schon nach einer Begasung eine feintropfige zentrale Läppchenverfettung, die im Laufe der ersten 10 Tage immer weitere Bezirke des Leberläppchens einnimmt, allmählich zu einer diffusen Leberverfettung und in den nekrotischen Läppchenanteilen zu einer besonders grobtropfigen Fettspeicherung führt. Die im H.E.-Präparat hell erscheinenden, hydropisch verquollenen Zellen verlieren ihre Anfärbbarkeit in der PAS-Reaktion. Bis zum 7. Tag kommt es zu einer starken zentralen Abnahme der PAS-Positivität. Die sich von Zentrum zu Zentrum hinziehenden nekrotischen Zellstraßen sind ebenfalls farbfrei. Ubrige Läppchenzonen, insbesondere die Umgebung der Glisson'schen Felder, zeigen eine überstarke PAS-Reaktion. Vom 7. Tage an kommt es zu einem Stillstand der PAS-Abnahme; im Laufe der folgenden Begasungen, vom 8. - 10. Tag, wieder zu einem Anstieg. Die Straßen nekrotischer Zellen werden von den intakten Läppchenanteilen allmählich eingeengt.

H i s t o c h e m i s c h e B e f u n d e n a c h 1 b i s 10 B e g a s u n g e n .

Verhalten der alkalischen Phosphatase: in der Leber: Bereits nach einer Begasung zeigt die Leber besonders in den peripheren Läppchenanteilen einen deutlichen Aktivitätszuwachs. Das normale Verteilungsmuster der alkalischen Phosphatase, mit seiner besonderen Aktivitätsbetonung der Läppchenperipherie bleibt zunächst noch erhalten, ändert sich aber bereits am 3. und 4. Tag, indem das Läppchenzentrum deutlich an Aktivität einbüßt und fast frei von Farbstoff wird. Die Läppchenperipherie nimmt in ihrem Farbstoffgehalt aber weiterhin zu. Die Gesamtaktivität des Leberparenchyms ist vermehrt. Die zentrale, bis zum 4. Tag fermentarme Läppchenzone wird vom 5. bis zum 7. Tag

völlig frei von alkalischer Phosphatase. In der Umgebung der Zentralvene bildet sich ein fermentfreier Hof aus, der sich vom 8. bis zum 10. Tag bis in die äußeren Anteile der Läppchenintermediärzone ausbreitet. Die Läppchenperipherie und ganz besonders die Umgebung der Glisson'schen Felder zeigen hingegen eine ausgesprochen starke Fermentreaktion.

Verhalten der sauren Phosphatase in der Leber: Die saure Phosphatase zeigt in den ersten 3 Begasungstagen keine auffälligen Veränderungen gegenüber dem Normalbefund. Erst am 4. Tag beginnt eine zentrale Fermentabnahme. Die ferment-schwache Region breitet sich weiter aus, am 8. bis 10. Tag ist die Umgebung der Zentralvene fast fermentfrei. Die Peripherie ist dagegen, ähnlich wie bei der alkalischen Phosphatase, stark positiv. Auffällig ist bei dem geschädigten Lebergewebe der grobgranuläre Farbstoffausfall bei der Reaktion auf saure Phosphatase. Außerdem löst sich der entstehende Farbstoff in geringem Maße in den Fettröpfchen.

Verhalten der alkalischen und der sauren Phosphatase in der Niere: Während der Versuchsreihen zeigte die Niere weder qualitative noch quantitative Veränderungen der Fermentaktivität.

Morphologische Befunde nach 21, 78, 127, und 150 Begasungen an der Leber (Langzeitversuche).

Nach 21 Begasungen werden die bei den kurzzeitversuchen beschriebenen ausgeheilten nekrotischen Zellstraßen schmaler und vom erhaltenen Parenchym her eingeengt. Eine zarte Bindegeweßsprossung wird jetzt mit Hilfe der Bindegeweßfärbung nicht deutlich nachweisbar. Leberzellregenerate, sogenannte Gallengangswucherungen und Rundzellinfiltrate weisen auf den beginnenden Umbau hin. Nach 78 Begasungen sind Pseudolobuli deutlich ausgeprägt. 95, 127 und 150 Begasungen verdeutlichen ein Bild wie bei ausgeprägter Zirrhose mit starker Bindegeweßbildung, Gallengangswucherungen und Rundzellin-

filtraten. Nach 127 und 150 Begasungen kommt es zu einer diffusen Verfettung des gesamten Leberparenchyms. Im ganzen ist das Lebergewebe gleichmäßig PAS-positiv, nur vereinzelt finden sich etwas aufgehellte Zellen.

Histochemische Befunde bei Langzeitenversuchen.

Verhalten der alkalischen Phosphatase in der Leber: Nach 21 Begasungen, wenn sich zarte Bindegewebsfasern in den verfetteten und nekrotischen Bezirken bilden, zeigt das erhaltene Leberparenchym eine ausgesprochen starke Fermentreaktion. Nekrotische Bezirke und das junge Bindegewebe sind enzymfrei. Nach 78 und 95 Begasungen ändert sich das Bild kaum: starke Fermentreaktion in den Gallkapillaren, keine Reaktion in den nekrotischen und verfetteten Zellstraßen. Nach 127 und 150 Begasungen beobachten wir auch eine schwach positive alkalische Phosphatase-Reaktion in den bindegewebigen Septen.

Verhalten der sauren Phosphatase in der Leber: Das Verteilungsmuster der sauren Phosphatase entspricht nach 21 Tagen fast dem der alkalischen Phosphatase: das erhaltene Parenchym reagiert stark positiv, verfettete und nekrotische Gewebsteile sind ebenso wie die Bindegewebssepten enzymnegativ. Fettbeladene Zellen lösen den Azo-Färbstoff in ihren Fettröpfchen. Auch fällt der durch die Fermentreaktion entstandene Farbstoff grobgranulär aus.

Quantitative Untersuchungen über die Enzymaktivität.

Es war unser Ziel, die Auswertung unserer histochemischen Befunde durch exakte quantitative Bestimmungen der Fermentaktivität zu untermauern. Das von uns oben angegebene Extraktionsverfahren zur quantitativen Ermittlung der Fermentaktivität im Gewebe kam bei unseren CCl_4 -Versuchen zur Anwendung. Einzelheiten der Aktivitätsschwankungen im Laufe

der einzelnen Versuchsstadien veranschaulichen die graphischen Darstellungen (Abb.7). Die Kurven zeigen den normalen Streubereich der Enzymaktivität beim Normaltier und die Aktivitätsschwankungen unter unseren Versuchsbedingungen. Es zeigte sich, daß die Ergebnisse, die wir durch das Extraktionsverfahren ermittelten, mit unseren Schätzbefunden gut übereinstimmten. Wir sahen nach zwei CCl_4 -Begasungen eine erheblich vermehrte Farbstoffablagerung in den Leberschnitten und ermittelten quantitativ einen Anstieg von 0,12 mg Farbstoff / 1mg Gewebe (normal) auf 0,79 mg Farbstoff / 1mg Gewebe.

b) Versuche mit Sublimat
(HgCl₂).

Versuchsordnung: Die Tiere bekamen täglich eine intraperitoneale Injektion einer subletalen Sublimatdosis in 1 ‰ starker wässriger Lösung.

Ermittlung der Dosis letalis: Staemmler gibt als Dosis letalis 0,3 bis 0,5 mg Sublimat pro 100 g Körpergewicht an. Lapp und Schafé ermittelten bei ihren Versuchen 0,15 mg Sublimat pro 100 g Körpergewicht. Wir verwendeten wie Staemmler eine 1 ‰ starke wässrige Lösung.

Zur Ermittlung der Dosis letalis spritzten wir je 6 Tieren 0,5, weiteren 6 0,4, weiteren 6 0,3 und schließlich noch einmal 6 Tieren 0,2 mg Sublimat pro 100 g Körpergewicht. Bei Dosen von 0,5 und 0,4 mg gingen sämtliche Tiere innerhalb von 4 bis 5 Tagen nach der Injektion ein. Bei einer Dosis von 0,3 mg überlebten 4 Tiere, bei 0,2 mg Sublimat pro 100 g Körpergewicht überlebten alle 6 Tiere. Als Zwischenwert erprobten wir noch eine Dosis von 0,35 mg pro 100 g Gewicht, dabei überlebte von 6 Tieren nur eines. Wir betrachteten eine Sublimatdosis von 0,35 mg pro 100 g Körpergewicht als die Dosis letalis (Staemmler), eine Dosis von 0,3 als subletal.

Es erscheint uns wichtig, bei der Frage nach der letalen Sublimatdosis darauf hinzuweisen, daß nur Tiere unter gleichen Lebens- und Ernährungsbedingungen auf dieselbe Dosis gleichartig reagieren. Hungert zum Beispiel ein Tier drei Tage, so übersteht es eine sonst sicher letale Dosis, auch wenn es im Gewicht einem normal ernährten Tier nicht nachsteht. Ebenso vertragen junge Tiere nicht die gleiche Dosis wie größere und ältere. Wir halten es deshalb nicht für ganz ausreichend, die Dosis letalis lediglich auf eine Gewichtseinheit zu definieren. Ernährungsweise und Alter der Tiere dürfen nicht außer Acht gelassen werden. Deshalb verwendeten wir bei unseren Versuchen nur gleichartig ernährte und gleichgewichtige Versuchstiere.

Wir verfolgten die Auswirkung einer einmaligen intraperitonealen Sublimatinjektion mit der subletalen Dosis von 0,3 mg

pro 100 g Körpergewicht an zwei Versuchsreihen, jede Reihe mit jeweils 12 Tieren. Wir untersuchten Niere und Leber nach 4 und 10 Stunden, nach einem Tag, nach 2 Tagen und dann alle zwei Tage bis zu 20 Tagen Überlebenszeit.

Morphologische Befunde an der Niere.

Vier Stunden nach der Sublimatinjektion ist noch kein grober pathologischer Befund zu erheben. Ganz vereinzelt erscheinen Tubulusepithelien mit krümelig entmischem Zytoplasma. Sonst ist der Befund unauffällig. Verfettungen sind nicht nachweisbar. Bereits nach 10 Stunden sind besonders in den proximalen Tubuli Epithelnekrosen und vereinzelt ein Bürstensaumverlust zu sehen. Im PAS-Präparat stellt sich der in die Tubuluslichtungen abgestoßene Bürstensaum als homogener leuchtend roter Zylinder dar. In den basalen Anteilen der geschädigten Tubulusepithelien finden wir vereinzelt feintropfige Verfettungen. Nach 24 Stunden sind fast alle proximalen Tubuli nekrotisch. Die Zylinder, die sich bei der PAS-Färbung leuchtend rot darstellen, sind stark vermehrt. Auch die Verfettungen im Bereich der proximalen Tubuli nehmen zu. Die Glomerulumschlingen, die bisher nichts Auffälliges zeigten, erscheinen hyperämisch und weisen manchmal eine geringe Zellzahlvermehrung auf. Nach 2 Tagen erfassen die Tubulusnekrosen fast alle Hauptstücke. Verfettungen sind besonders in der äußeren Markzone, teilweise auch in der inneren Rindenzone deutlich. Zylinder sind fast in allen Tubulusabschnitten als homogene Massen sichtbar. Am 3. Tag sind die Epithelien der proximalen Tubuli größtenteils nekrotisch, Schaltstücke und Sammelrohre sind erhalten, die Tubuluslichtungen sind von homogenen Massen angefüllt. In der inneren Rindenzone zeigen die Henleschen Schleifen eine feintropfige Verfettung. Die Glomerula sind noch hyperämisch. Die Anfärbbarkeit bei der PAS-Reaktion nimmt in den ersten Versuchsstadien, von 3 Stunden bis zu 4 Tagen deutlich ab. Am 6. Tag hat die Zahl der Zylinder deutlich abgenommen und wir beobachten regenerative Vorgänge. Es stellen sich wieder Tubulusepithelien dar, mit zarten, besonders im PAS-Präparat

deutlichen Bürstensaumen. Am 8. Tag hat die Regeneration weitere Fortschritte gemacht, flache Epithelien mit feinen Bürstensaumen stellen sich im PAS-Bild wieder kräftig dar. Die Tubuluslichtungen sind weit, die Zylinder werden spärlicher und liegen mehr in den distalen Abschnitten. Die Glomerula zeigen keinen pathologischen Befund mehr. Vereinzelt liegen in den Tubuluslichtungen krümelige, sich mit Hamatoxylin stark anfärbende Kalkmassen. Nach 10 Tagen sind fast alle Tubulusepithelien wieder hergestellt. Zylinder und Verfettungen sind nur noch ganz vereinzelt nachweisbar. Hier und da sind die Tubuli noch von krümeligen Kalkmassen angefüllt. Die Anfärbbarkeit bei der PAS-Reaktion nimmt weiter zu. Nach 12 Tagen erscheint das Nierenparenchym fast wieder normal, nur noch vereinzelt finden wir aufgehellte Epithelien und spärlich Zylinder. Die PAS-Reaktion nähert sich der Norm. 14 Tage nach der Sublimatinjektion weisen nur noch ganz geringe Veränderungen auf den durchgemachten Schaden hin. Die Tubuli sind regeneriert, einzelne proximale Tubuli sind weit, die Epithelien noch etwas flach und die Bürstensaume haben noch nicht ihre volle Dicke erreicht. Verfettungen sind nicht mehr nachweisbar. Nur ganz vereinzelt finden wir noch Kalkkrümel in distalen Tubulusabschnitten. Das PAS-Präparat ist wieder normal. Nach 16 Tagen ist morphologisch wieder der Normalzustand erreicht. Wir sehen keine Zylinder und Verfettungen mehr. Nach 20, 35, 45 Tagen ebenfalls kein pathologischer Befund.

Histochemische Befunde an der Niere.

Verhalten der alkalischen Phosphatase: 4 Stunden nach der Sublimatinjektion erscheint das Verteilungsmuster der alkalischen Phosphatase und die Stärke der Reaktion normal. Die Bürstensaume sind kräftig positiv, die Tubulusepithelien unverändert. Bereits nach 10 Stunden kommt es aber zu auffälligen Veränderungen: die Bürstensaume sind schwächer als normal angefärbt, vereinzelt sind ganze Tubuluslichtungen von homogenen phosphatasepositiven Massen angefüllt. In den proximalen Tubulusabschnitten, die jetzt schon zum Teil nekrotisch sind, ist die Zeichnung der

fermentpositiven Bürstensäumen verwaschen. Zylinder, die sich bei der Phosphatase-Reaktion stark blau färben, sind in der Rinde reichlich zu sehen. Nach einem Tag, morphologisch bestehen starke Schäden, zeigt besonders die äußere Rindenzone eine diffuse Blaufärbung der nekrotischen Zellmassen. Im ganzen zeigt das Nierenparenchym einen Verlust an Fermentaktivität. Überall, am stärksten im Mark, phosphatase-positive Zylinder. Nach 2 Tagen nimmt die Enzymaktivität weiter ab. In der äußeren Rindenzone finden sich reichlich schollige Massen, die sich blau anfärben. Am 3. Tag kommt es zu einer weiteren Farbstoffabnahme, die Zylinder und nekrotischen Zellanteile färben sich blass blau. Am 4. Tag finden sich nur noch ganz vereinzelt fermentpositive Bürstensäume und reichlich Zylinder in Rinde und Mark. Am 6. Tag, dem Zeitpunkt der ersten Regeneration, stellen sich unter den Zylindern flache Epithelien mit einem zarten phosphatase-aktiven Bürstensaum dar. Besonders im Mark finden sich noch Zylinder, ihre Anzahl nimmt jedoch gegenüber den Vortagen ab. Auch zeigen die Zylinder jetzt nur noch eine schwache Fermentreaktion. Im ganzen ist die Phosphatase-Reaktion abgeschwächt. Ein deutlicher Fortschritt zeigt sich nach 8 Tagen. Die Epithelien gewinnen an Höhe, der Bürstensaum an Phosphatase-Aktivität und stellt sich daher kräftig blau dar. Fermentaktive Zylinder sind jetzt nicht mehr zu finden. In der Übersicht erscheint die Fermentreaktion abgeschwächt. Am 10. Tag zeigen fast alle Hauptstückepithelien wieder einen enzymhaltigen Bürstensaum, wenn auch die Reaktion noch schwächer ausfällt. Nach 12 Tagen ist etwa das Normalbild erreicht. Die Hauptstückepithelien tragen wieder einen intakten Bürstensaum, die Farbstoffbeladung ist im ganzen noch etwas abgeschwächt. Nach 16 bis 20 Tagen ist der Phosphatase-Gehalt im histochemischen Bild wieder normal. Alle in noch späteren Stadien untersuchten Tiere (nach 27, 38 und 45 Tagen) hatten eine völlig normalen Befund.

Verhalten der sauren Phosphatase: 4 und 10 Stunden nach der Sublimatinjektion zeigt die Rattenniere bei der Darstellung der sauren Phosphatase keinen von der Norm abweichenden Befund. Nach einem Tag beobachten wir im ganzen eine leichte Abnahme

der Fermentaktivität. Die Basis der Tubulusepithelien färbt sich deutlich positiv an, während die die Lichtung ausfüllenden Massen (abgestoßene Bürstensaume) keine Reaktion auf saure Phosphatase geben. Am 2. und 3. Tag erfolgt weiter eine stetige, aber geringe Abnahme der Fermentaktivität. Die geschädigten Epithelien der äußeren Kindenzone lassen sich jedoch noch gut anfärben. Am 4. und 6. ändert sich der Befund kaum. Nach 8 und besonders nach 10 Tagen scheint der Farbstoffgehalt im Nierenparenchym wieder anzusteigen. Am 12. und 14. Tag erscheint das histochemische Bild, abgesehen von einzelnen fleckförmigen Aufhellungen in den Epithelien fast wieder normal. Am 16. und 20. Tag, ebenso in den Spätstadien nach 27, 38 und 45 Tagen ist das völlige Normalbild wieder erreicht.

Morphologische Befunde an der Leber.

Vier Stunden nach der Sublimatinjektion erscheint das Leberparenchym normal, jedoch nach 10 Stunden kommt es zu einer feintropfigen lappchenperipheren Verfettung. Die PAS-Reaktion zeigt keinen pathologischen Befund. Nach einem Tag sieht man einzelne, gleichmäßig über das Parenchym verstreute Leberzellen mit hydropischer Degeneration, daneben lappchenperiphere Verletzungen. Bei der PAS-Färbung zeigen die hydropisch degenerierten Zellen eine geringe Reaktion. Am 2. Tag im H.E.-Präparat gegenüber dem Vortag keine nennenswerten Veränderungen. Die lappchenperipherie verliert an PAS-Anfärbbarkeit. Am 4. Tag kommt es zu einem Rückgang der peripheren Verfettungen, die PAS-Reaktion ist uncharakteristisch. Am 6. und 8. Tag ist die PAS-Färbung normal. Am 10. bis 14. Tag erscheint das Lebergewebe ebenso wie nach 16 und 20 Tagen normal. Auch bei den untersuchten Spätstadien fand sich kein pathologischer Befund.

Histochemische Befunde an der Leber.

Verhalten der alkalischen Phosphatase: Vier Stunden nach der Sublimatinjektion gleicht das Verteilungsmuster und die Stärke der Reaktion dem Normalbild. Nach 10 Stunden kommt es zu auffälligen Veränderungen: starker Aktivitätszuwachs der al-

kalischen Phosphatase (Abb. 10), dabei bleibt das normale Verteilungsmuster mit Betonung der Läppchenperipherie erhalten. Am 4. Tag steigt die Fermentaktivität weiter an, auch sind die Gallenkapillaren des Läppchenzentrums jetzt stark positiv. Am 5. und 6. Tag kommt es zu einer leichten Abnahme der Phosphatasen-Reaktion im Läppchenzentrum. Nach 8 Tagen Fermentgehalt und Verteilungsmuster normal. Am 10., starker noch am 12. Tag kommt es wieder zu einer Aktivitätssteigerung, bei einem Tier kam es am 16. Tag zu einem leichten Abfall. Am 20. Tag ist sowohl der Fermentgehalt wie auch das Verteilungsmuster wieder normal. Die untersuchten Spätstadien ergaben ebenfalls einen normalen Befund.

Verhalten der sauren Phosphatase: Bei der sauren Phosphatase beobachteten wir weder histochemisch noch quantitativ signifikante Veränderungen.

Ergebnisse der quantitativen Untersuchungen
über die Enzymaktivität.

Mit der oben näher beschriebenen Methode haben wir die Aktivitätsschwankungen der sauren und alkalischen Phosphatasen in Leber und Niere der Ratte gemessen. Die quantitativen Ergebnisse verglichen wir mit den jeweiligen histochemischen Bildern. Es zeigte sich, daß die Schätzwerte mit den Messergebnissen parallel gingen. Schätzungen erfolgten nach Normalpräparaten. Die Messwerte sind aus den Abbildungen 7, 8 und 9 ersichtlich.

C. D i s k u s s i o n .

Die Gruppe der Phosphatasen umfasst eine Reihe hydrolytischer Fermente, die verschiedene Phosphatester in vitro spalten, deren natürliches Substrat wir aber nicht kennen. Den Wirkungsmechanismus der Phosphatasen im intermediären Stoffwechsel kennt man heute noch nicht, es gilt aber als sicher, daß phosphatspaltende Enzyme die Ossifikation steuern. Eine Einteilung dieser Fermente erfolgte einmal nach ihrem pH-Optimum, zum anderen nach ihrem Verhalten gegenüber verschiedenen organischen Phosphatestern (Lit. bei Ammon und Dirscherl 1959 und bei Richterich 1958). Es zeigte sich, daß die Phosphatasen ausgesprochen unspezifisch sind, sie spalten in vitro eine große Anzahl organischer Phosphorsäureester (Gomori 1949).

Die Bildung der alkalischen Phosphatase erfolgt wahrscheinlich zum Großteil in den Osteoblasten (Robinson und Soames 1924, Lit. bei Richterich 1958). Das Ferment gelangt aus den Osteoblasten in das Blutserum und wird durch die Leber in aktiver Form in die Galle ausgeschieden (Lit. bei Popper und Schaffner 1961). Kay zeigte 1930 als erster, daß Knochen- und Serumphosphatase identisch sind. Ob die alkalische Phosphatase in der Leber auch selbst gebildet wird, war Gegenstand vieler Untersuchungen, wird aber heute von den meisten Autoren abgelehnt (Richterich 1959; Lit. bei Popper und Schaffner 1961). Die Ermittlung der Aktivität der alkalischen Phosphatase im Serum des Menschen hat erhebliche diagnostische Bedeutung erlangt, so ist zum Beispiel in 90 % der Fälle von Obstruktionsikterus die Fermentaktivität deutlich erhöht, worauf Roberts 1930 erstmals hinwies.

Die saure Phosphatase findet sich beim Menschen und bei höheren Säugern in der Prostata, in der Niere und in der Leber. Über ihre Aufgaben im Stoffwechsel und ihre Ausscheidung ist nichts bekannt (Ammon und Dirscherl 1959). Nach neueren Untersuchungen besteht die saure Phosphatase wahrscheinlich aus drei Fermentfraktionen, die sich durch ihre verschiedene Wanderungsgeschwindigkeit bei der Elektrophorese, durch ihre pH-Optima und ihre histochemische Lokalisation unterscheiden (Barka 1961; Burstone 1961).

Im Jahre 1939 gelang erstmals Gomori die histochemisch Darstel-

lung der alkalischen Phosphatase. Gomori inkubierte Gewebeschnitte in einer alkalischen Glycerophosphatlösung, der er Ca-Ionen zusetzte. Die abgespaltenen Phosphatreste fielen als Ca-Phosphat aus, die in einer zweiten Inkubation in schwarzes Ca-Sulfid umgewandelt wurden.

1944 entwickelten Menten, Junge und Green ein neues Verfahren zur Darstellung der alkalischen Phosphatase. Hierbei wird der organische Rest des fermentativ gespaltenen Substratmoleküls in einen leuchtenden Azo-Farbstoff umgewandelt. 1949 erweiterten Belligman und Manheimer diese Methode zur Darstellung der sauren Phosphatase. In neuerer Zeit erschien eine Reihe wissenschaftlicher Arbeiten, die bessere Farbstoffe (Goessner 1958) und Substrate (Burstone 1958, 1960 und 1961) vorschlugen.

In der vorliegenden Arbeit verwandten wir zur Darstellung der alkalischen Phosphatase Naphthol AS-TK Phosphat (Burstone 1958) als Substrat und Variaminblausalz B (Goessner 1958) als Diazonium-Komponente. Bei der sauren Phosphatase verwandten wir Fast Garnet GBC Salt als Diazoniumsalz und α -Naphtholphosphat als Substrat. Diese Farbstoffe und Substrate ergaben gute histochemische Bilder und eigneten sich für unser Extraktionsverfahren, das unten näher diskutiert werden soll.

Das normale Verteilungsmuster der alkalischen und sauren Phosphatase in Rattenleber und Rattenmilch ist oben ausführlich beschrieben und soll hier nur kurz aufgeführt werden. Die alkalische Leberphosphatase findet sich in den Lumina der Gallkapillaren, besonders reichlich in der Lappchenperipherie. Auch die Innenauskleidung der Sinusoide zeigt eine schwach positive Reaktion. Die saure Phosphatase liegt in den Leberzellen, auch hier zeigt sich eine Betonung der peripheren Lappchenanteile. Bei beiden Reaktionen sind die Kerne negativ. In der Rattenmilch sind die lumennahen Zellanteile und die Bürstensaume der proximalen Tubuli reich an alkalischer Phosphatase. Ganzlich frei sind die Glomeruli und die Zellkerne. Auch die saure Nierenphosphatase liegt intracytoplasmatisch, die Zellkerne zeigen ebenfalls keine Reaktion. Unsere Befunde deckten sich mit den Ergebnissen anderer Autoren in allen Einzelheiten (Belligman und Manheimer 1949; Wachstein 1955; Lit. bei Pearse 1960).

Um die Intensität der Fermentreaktion zahlenmäßig erfassen zu

können, ergänzen wir unsere histochemischen Untersuchungen durch ein quantitatives Verfahren, das im folgenden kurz diskutiert werden soll.

Fermente katalysieren in der Zeiteinheit den Umsatz einer festen Menge von Substratmolekülen (Umsatzzahl). Die Umsatzzahl ist vom pH, von der Anwesenheit hemmender und aktivierender Ionen und von der Substratkonzentration abhängig. Schaffen wir uns in der Inkubationslösung immer gleiche Reaktionsbedingungen, so ist die Anzahl der gespaltenen Substratmoleküle nur noch von der Fermentkonzentration abhängig. Der vom Substrat abgespaltene organische Rest wird von der Diazoniumkomponente, die im Inkubationsmedium gelöst ist, Molekül für Molekül abgefangen und zum sichtbaren Farbstoff ausgefällt. Extrahieren wir diesen Farbstoff in einer festen Menge eines geeigneten Extraktionsmittels, so ist die Konzentration der Farbstofflösung pro Gewichtseinheit Gewebe ein Maß für die Anzahl der gespaltenen Substratmoleküle. Dieses Prinzip liegt unserer Extraktionsmethode zugrunde. Als Extraktionsmittel eignete sich besonders Aceton, es löste die Azo-Farbstoffe schnell und restlos aus den Gewebsschnitten.

Wir fanden, daß die alkalische Phosphatase aus 1mg Rattenleber in 90 Minuten 0,12mg Azo-Farbstoff, die alkalische Nierenphosphatase in 5 Minuten in 1mg Nierengewebe 1,59mg Azo-Farbstoff bildet. Die saure Phosphatase aus 1mg Rattenleber bildet in 25 Minuten 0,269mg, aus 1mg Rattenniere 0,280mg Azo-Farbstoff in 20 Minuten.

Mit den oben besprochenen histochemischen Methoden und dem daraus abgeleiteten quantitativen Verfahren verfolgten wir das Verhalten der alkalischen und sauren Phosphatasen der Rattenleber und Rattenniere unter CCl_4 - und HgCl_2 -Intoxikation.

Diskussion über die Ergebnisse der CCl_4 - Versuche.

Die morphologischen Veränderungen am Leberparenchym waren Gegenstand vieler wissenschaftlicher Untersuchungen. Die Auswirkungen der Tetrachlorkohlenstoffvergiftungen wurden an Mäusen, Ratten, Kaninchen, Hunden und Katzen beschrieben (Mit. bei Popper und Schaffner 1961). Die Versuchstiere erhielten das Gift entweder

in reiner Form oder in Olivenöl gelöst oral (Leewy et al. 1959). Andere Autoren bevorzugten die intraperitoneale oder intrasplenale Injektion (Myren et al. 1956). McCloskey et al. (1950) verabfolgten CCl_4 subcutan und durch Inhalationen. Hoffmann et al. (1956) beobachteten die Auswirkungen akuter und hochdosierter CCl_4 -Intoxikationen, Wahli et al. (1956) und Atermann (1954) beschrieben die Leberveränderungen nach monatelanger CCl_4 -Exposition. Wegen der einfachen Anwendbarkeit bevorzugten wir das Inhalationsverfahren.

Wir exponierten die Tiere täglich einmal 6 Minuten in einem 40 l-Behälter, in dem 6 ml CCl_4 verdampft waren. Wir untersuchten Leber und Nieren der Ratten nach 1 bis 10 Tagen sowie nach 21, 78, 95, 127 und 150 Tagen. An der Rattenleber beobachteten wir nach wenigen Tagen hydropische Zellschwellungen im Läppchenzentrum, nach 6 bis 10 Tagen, ebenfalls läppchenzentral, Verfettungen und Nekrosen. In späteren Versuchsstadien sehen wir Bindegewebsproliferation mit Pseudoglobulibildung, Gallengangsregenerate und schließlich das Bild wie bei einer Lebercirrhose.

In allen Versuchsstadien untersuchten wir histochemisch und morphologisch die Rattennieren, fanden aber keine nennenswerten Veränderungen.

Einige Veröffentlichungen beschäftigen sich mit dem Verhalten der Leberphosphatasen nach CCl_4 -Intoxikation (Stowell und Lee 1951; Talageri et al. 1952; Auer 1954; Bejal et al. 1955; Petzold 1959). Die genannten Autoren legten ihren Untersuchungen die Metallsalzmethode von Gomori zugrunde, deren Ergebnisse mit den Diazonium-Methoden wegen ihrer unterschiedlichen histochemischen Befunde nicht verglichen werden können. Wir gehen deshalb auf diese Arbeiten nicht näher ein. Bei unseren Versuchen verwandten wir, wie oben betont, das Azo-karostoff-Verfahren. Schon nach wenigen CCl_4 -Begasungen beobachteten wir einen starken Aktivitätszuwachs der alkalischen Phosphatase. Am 3. und 4. Begasungstag wurde das Läppchenzentrum frei von alkalischer Phosphatase, die Peripherie und auch die Intermediärzone des Leberläppchens waren weiterhin stark positiv. Bis zum 10. Tag war ein breiter Saum um die Zentralvene fermentnegativ, während die Gallenkapillaren der Intermediärzone und der Peripherie übernormal starke Fermentreaktion zeigten. Bei unseren Langzeitenver-

suchen sahen wir eine verstärkte Phosphatasenreaktion in den Gallenkapillaren des erhaltenen Leberparenchyms, im Cirrhose-Stadium eine deutlich erhöhte Reaktion in den Pseudolobuli. Unsere vergleichenden quantitativen Messungen gingen parallel mit den Schätzwerten: ein steiler Aktivitätsanstieg in den ersten Versuchsstadien (2-3 Begasungen), danach ein geringer Abfall auf schwach übernormale Werte und eine weiterhin erhöhte Reaktion bis in die späten Versuchsstadien (150 Begasungen).

Die saure Phosphatase zeigte in den ersten 3 Begasungstagen keine auffälligen Veränderungen. Am 4. Tag kam es zu einer Läppchenzentralen Fermentabnahme, die sich bis zum 8. und 10. Tag weiter ausbreitete, wobei die Läppchenperipherie aber stark positiv reagierte. Während der Langzeitenversuche reagierte das Parenchym der Pseudolobuli stark positiv, verfettete sowie nekrotische Zellen und die Bindegewebssepten waren negativ. Bei der quantitativen Fermentbestimmung beobachteten wir während aller Versuchsstadien keine großen Abweichungen vom Normalbereich, weil sich der läppchenzentrale Fermentschwund auf der einen Seite und die periphere Zunahme auf der anderen Seite ausglich.

Wie nun konnte man sich den starken Aktivitätsanstieg der alkalischen Leberphosphatase nach wenigen CCl_4 -Begasungen und die dauernd erhöhte Reaktion während der späten Versuchsstadien erklären? Da nach CCl_4 -Intoxikationen sowie nach vielen anderen Vergiftungen die alkalische Serumphosphatase ansteigt (Kritzler 1959; Wachstein et al. 1950; Bejdl et al. 1955) und sich am acinoperipheren Läppchenparenchym keine wesentliche Schädigung, vielmehr ganz im Gegenteil die Anzeichen einer Funktionssteigerung zeigen, möchten wir vermuten, daß die gesteigerte Enzymaktivität in den Gallenkapillaren als Ausdruck einer gesteigerten Ausscheidung der im Serum vermehrten alkalischen Phosphatase durch die nicht geschädigten und funktionell aktivierte Leberzellen der Läppchenperipherie anzusehen ist. In den ersten Versuchstadien fanden wir keinen Anhalt für eine Galleabflußbehinderung, im "Cirrhose-Stadium" allerdings läßt sich eine Gallestauung mit Sicherheit nicht ausschließen. Unter der letztgenannten Voraussetzung würde die aufgestaute fermenthaltige Galle den Aktivitätszuwachs im Schnitt und die

gesteigerte Fermentaktivität pro Gewichtseinheit Lebergewebe erklären. Sollte sich die These derjenigen Autoren bestätigen, die eine intrahepatische Bildung der alkalischen Phosphatase annehmen (Lit. bei Popper und Schaffner 1961) so müssten wir den Anstieg der Phosphatase im Serum als Ausscheidungsinsuffizienz deuten. Gegen diese Annahme sprechen aber entscheidend der starke Fermentanstieg in den Gallekapillaren und die Feststellung, daß die peripheren Läppchenanteile nicht geschädigt sondern funktionell aktiviert sind.

Wie nun ließe sich der starke Aktivitätsanstieg der alkalischen Serumphosphatase nach CCl_4 -Intoxikationen und nach vielen anderen Vergiftungen deuten? Wir wollen diese Frage zurückstellen und im Zusammenhang mit unseren histochemischen Befunden, die wir nach Sublimatintoxikation an der Leber erheben konnten, diskutieren.

Diskussion über die Ergebnisse der HgCl_2 -Versuche.

Die charakteristischen morphologischen Veränderungen am Nierengewebe, die nach Sublimatvergiftung zum Bild der Sublimatnephrose führen, sind in den Arbeiten von Elbe, Weiler und neuerdings von Staemmler, Lapp und Schafé sowie Moltenius beschrieben. Schwellungen, scholliger Zerfall und Nekrosen der Hauptstückepithelien und Abstoßung ganzer Zellanteile in das Tubuluslumen gelten als typische Veränderungen nach Sublimatvergiftung. Die oben genannten Autoren beobachteten keine Schäden an den Glomerula. Dahingegen sah Carpeneto, allerdings nach hochdosierter Sublimatvergiftung, Risse in den Glomerulumschlingen und Nekrosen an den Kapillarendothelien, die Staemmler als postmortale Veränderungen ansprach. Die morphologischen Befunde an den Tubuli, die wir in unseren Versuchsreihen erheben konnten, decken sich mit den von Elbe und Staemmler beschriebenen, dazu beobachteten wir mehrere Tage nach der HgCl_2 -Injektion eine Hyperämie der Glomerulumkapillaren.

Staemmler, Lapp und Schafé sowie Sachs und Dulskas beschrieben das Verhalten der Phosphatasen bei Sublimatnephrose. Staemmler vermißte einen Aktivitätsverlust an alkalischer und saurer Nierenphosphatase im Laufe der Sublimatschädigung, selbst bei erheblichen Tubulusnekrosen. Lapp und Schafé dagegen, beschrieben einen Abfall der Fermentaktivität mit einem Minimum um den 7. bis 9. Tag nach der Sublimatinjektion und anschließender Erholung. Auch Sachs und Dulskas beobachteten einen Aktivitätsrückgang der alkalischen Phosphatase, allerdings nach hochtoxischen Sublimatkonzentrationen. Nach kleinen HgCl_2 -Dosen soll sich die Aktivität der alkalischen Phosphatase steigern, jedoch untersuchten sie die geschädigten Organe in Abständen von 3 Wochen und erfassten somit die Veränderungen in den Zwischenstadien nicht. Die histochemische Nachweismethode der alkalischen und sauren Phosphatasen, die in den obergenannten Arbeiten angewandt wurde, ließ keine genauen quantitativen Schätzungen zu.

Das Verhalten der alkalischen und sauren Phosphatasen nach einmaliger subletaler Sublimatintoxikation erscheint nach den bisher veröffentlichten Arbeiten noch nicht eindeutig geklärt und

wurde deshalb von uns durch histotopochemische und quantitative Untersuchungen ergänzt.

Bei unseren Versuchen verfolgten wir das Verhalten der alkalischen und sauren Phosphatasen mit Azo-Farbstoff-Methoden. Schon 10 Stunden nach der Sublimatinjektion beobachteten wir auffällige Veränderungen: die Bürstensäume waren teilweise zerstört und schwacher Ferment-positiv. Nach 2 Tagen sahen wir in Sammelrohren phosphatase-positive Zylinder. Am 4. bis 6. Tag waren die Bürstensäume fast vollständig in die Tubuluslumina abgestoßen. Nach dem 6. begann die Regeneration des Tubulusepithelien, die wieder einen feinen phosphatasehaltigen Saum erkennen ließen. Nach 8 bis 12 Tagen gewannen die Epithelien wieder an Höhe und zeigten einen stark mit alkalischer Phosphatase beladenen Bürstensaum. Quantitativ kam es nach 4 Tagen zu einem starken Abfall der alkalischen Phosphatase, der am 6. bis 10 Tag einen Tiefpunkt erreichte. Vom 14. Tag an stieg die Fermentaktivität und erreichte nach 18 bis 20 Tagen wieder mittlere Normalwerte.

Der deutliche Abfall der Fermentaktivität im Nierenparenchym läßt verschiedene Deutungen zu. Es könnte sich um eine direkte Inaktivierung des Fermentes im Organ durch das Toxon handeln. Die Eiweißkomponente des Fermentes würde auf diesem Wege direkt durch das Hg-Ion denaturiert und funktionslos gemacht werden, dagegen spricht allerdings die noch erhaltene Fermentaktivität in den Zylindern. Außerdem ist es fraglich, ob das Sublimat in einer so hohen Konzentration im Primärharn ausgeschieden wird, die in den Tubuluslichtungen eine Eiweißausfällung bewirken kann (Stämmier). Wir neigen dazu, den starken Verlust an alkalischer Phosphatase auf die Abschmelzung und Ausschwemmung der fermenthaltigen Zellanteile der Tubulusepithelien zurückzuführen. Es gelang uns, fermenthaltige Zylinder, die fraglos aus abgestorbenen Zelltrümmern bestanden, im Harnsediment nachzuweisen. Sublimat schädigt besonders die proximalen Tubuli und die Bürstensäume (Stämmier 1956) und damit die Zellanteile, die alkalische Phosphatase enthalten. Bei der sauren Phosphatase beobachteten wir keinen erheblichen Aktivitätsverlust, wohl weil die basalen Zellanteile, Hauptlokalisation der sauren Phosphatase

tase , bei Sublimatintoxikation nicht so geschädigt werden. Der Tiefpunkt der Aktivität der alkalischen Phosphatase geht mit einer maximalen Schädigung der Bürstensäume einher. Die dann einsetzende Regenerationsphase läßt sich am Ansteigen der Fermentaktivität in den Bürstensäumen ermessen. Die starken Schäden im Nierengewebe nach einer subletalen Sublimatinjektion erreichen nach 5 bis 8 Tagen ihr Maximum und sind nach der erstaunlich kurzen Zeit von 14 bis 16 Tagen wieder regeneriert. Auch die PAS-Reaktion zeigt wieder ein normales Aussehen, die Bürstensäume stellen sich wieder gut dar. Die alkalische Phosphatase zeigt zu einem Zeitpunkt morphologischer Wiederherstellung noch nicht wieder ihre volle Aktivität, was sich weniger im histochemischen Bild, als durch die quantitative Aktivitätsmessung nachweisen läßt. Die Darstellung der alkalischen Phosphatase erwies sich deshalb als empfindlicher Test für die funktionelle Regeneration der Niere. Die Wiederherstellung der Enzymaktivität "hinkte" der morphologischen RepARATION nach.

Die morphologischen Veränderungen an der Leber sind oben näher beschrieben. Die angeführten Arbeiten über Sublimatnephrose berücksichtigen die Leberveränderungen nicht. Auffallend waren unsere histochemischen Befunde: ähnlich wie bei unseren CCl_4 -Versuchen beobachteten wir schon kurz nach der Intoxikation einen starken Aktivitätsanstieg der alkalischen Leberphosphatase, während die saure Phosphatase im Normbereich blieb. Wir wollen im folgenden das ähnliche Verhalten der alkalischen Leberphosphatase nach CCl_4 - und HgCl_2 - Vergiftung im Zusammenhang besprechen.

Die alkalische Phosphatase nach CCl_4 - und nach HgCl_2 -Vergiftung.

Wir besprachen oben unsere histochemischen Befunde an der Leber nach CCl_4 - Vergiftung und deuteten den starken Anstieg der alkalischen Phosphatase als Ausdruck einer gesteigerten Ausscheidung extrahepatisch gebildeter Fermente in die Galle. Auffallend war, daß wir auch nach der Sublimatvergiftung einen starken Aktivitätsanstieg der alkalischen Phosphatase in den Gallengängen sahen. Auch hier müssen wir an eine gesteigerte Fermentausschei-

ung durch die Leber denken, wenn auch Untersuchungen über das Verhalten der alkalischen Phosphatase im Serum nicht vorliegen. In diesem Zusammenhang möchten wir auf Arbeiten von Hauss und Leppelmann hinweisen, die Fermentschwankungen nach akuten Erkrankungen untersuchten. Die Verfasser kontrollierten nach akuten Krankheiten (Herzinfarkt, Tetrachlorkohlenstoffvergiftung, Operationen) die Aktivität einer willkürlich ausgewählten Fermentgruppe (Milchsauredehydrogenase, Aldolase, Tributyrinase und Cholinesterase) im Serum. Bei allen untersuchten Fällen war die Milchsauredehydrogenase und Aldolase kurz nach Krankheitsbeginn im Serum angestiegen, die Tributyrinase und Cholinesterase dagegen abgefallen. Nach wenigen Tagen hatten sich die Fermentaktivitäten wieder normalisiert. Diese gesetzmäßigen Aktivitätsschwankungen deuteten die Autoren als Ausdruck einer unspezifischen Reaktion des Organismus im Sinne der vegetativen Gesamtumschaltung nach F. Hoff. Wir möchten diese Deutung auch auf unsere Befunde ausweiten und den Anstieg der alkalischen Phosphatase in der Leber nach Tetrachlorkohlenstoff- und nach Sublimatintoxikation als unspezifische Reizantwort deuten.

V. Zusammenfassung.

Es wird eine quantitative histochemische Fermentbestimmungsmethode beschrieben, mit deren Hilfe Vergleiche zu qualitativ-histotochemischen Befunden über das Verhalten der alkalischen und sauren Phosphatasen in Leber und Niere der Ratte angestellt wurden.

Nach CCl_4 -Vergiftung (Begasungen) fand sich ein starker Aktivitätsanstieg der alkalischen Leberphosphatase nach wenigen (1-3) CCl_4 -Begasungen. Nach 6-9 Versuchstagen fiel die Fermentaktivität wieder auf Normalwerte ab, stieg danach aber wieder über den Normbereich hinaus an und blieb dann bis zum Ende der Versuchsreihen auf übernormalem Niveau. Die saure Phosphatase zeigte dagegen während der ganzen Versuchsdauer keine signifikanten Schwankungen aus dem Normalbereich. Der Anstieg der alkalischen Leberphosphatase wird auf eine gesteigerte Ausscheidung extrahepatisch gebildeten Fermentes zurückgeführt. Auf die zu- meist schon bekannten morphologischen Veränderungen an der Le-

Der nach CO_2 -Vergiftung wird kurz eingegangen. Auffallend war, daß die Rattenniere weder morphologische Veränderungen noch histochemisch oder quantitativ fassbare Veränderungen der alkalischen und sauren Phosphatase zeigte. Tetrachlorkohlenstoff erwies sich daher als hepatotropes Gift.

Nach subletalen Sublimatosen fiel ein starker Abfall der alkalischen Nierenphosphatase nach 2 Tagen auf. 16 bis 18 Tage nach der Injektion war an den Nieren kein pathologischer Befund mehr zu erheben, die volle fermentative Aktivität der alkalischen Phosphatase wurde nach 18 Tagen ermittelt. Die völlige Erholung der Phosphatasenaktivität hinkte der morphologischen Wiederherstellung etwas nach. Die saure Phosphatase zeigte keine erheblichen Aktivitätsschwankungen.

Der starke Verlust an alkalischer Nierenphosphatase nach einer subletalen Sublimatinjektion wird als Ausdruck einer Bürstensaumschädigung, der das Ferment besonders reichlich enthält, gedeutet. Gleichermassen wie nach Tetrachlorkohlenstoffvergiftung wurde nach Sublimatintoxikation ein starker Anstieg der alkalischen Phosphatase in der Leber beobachtet. Der Aktivitätszuwachs in den Gallikapillaren wird als Ausdruck einer gesteigerten Ausscheidung extrahepatisch gebildeter Phosphatase gedeutet. Die vermehrte Anflutung des Fermentes nach Tetrachlorkohlenstoff- und nach Sublimatvergiftung könnte Ausdruck einer unspezifischen Reizantwort des Organismus im Sinne der "vegetativen Gesamtschaltung" nach F. Hoff sein.

Schrifttum.

Ammon, K.; Lirscherl, W.:

fermente, Hormone, Vitamine.
Georg Thieme Verlag Stuttgart III Aufl.
156-185, (1959).

Atermann, A.:

Studies in fibrosis of the liver induced
by carbontetrachloride. I. Relation between
hepatocellular injury and new formation of
fibrous tissue.
Arch. of Path. 57, 1-11, (1954).
II. A quantitative study of the effect of
cortisone on fibrosis of the liver in rats.
Arch. of Path. 57, 26-29, (1954).

Barka, T.:

A simple azo-dye-method for histochemical
demonstration of acid phosphatase.
Nature 187, 248-249, (1960).

Barka, T.:

Studies of acid phosphatase. II. Chromatogra-
phic separation of acid phosphatase of rat
liver.
J. Histochem. Cytochem. 9, 564-571, (1961).

Barter, K.; Danielli, J. F.; Davies, H. G.:

A quantitative cytochemical method for
estimating alkaline phosphatase-activity.
Proc. Roy. Soc. (Lond) Ser. B. 144, 412-426, (1955).

Dejail, A.; Arampp, O.; Pillat, B.:

Histologische und funktionelle Veränderun-
gen des Leberzellparenchyms nach Tetrachlor-
kohlenstoffvergiftung an Ratten.
Wien klin. Wschr., 321-339, (1955).

Burstone, M. S.:

Histochemical comparison of naphthol-AS-sub-
strates.
J. Histochem. Cytochem. 6, 87-88, (1958).
The relationship between fixation and tech-
nique for the histochemical localisation of
hydrolytic enzymes.
J. Histochem. Cytochem. 6, 322-339, (1958).

- Histochemical demonstration of acid phosphatase with naphthol AS-phosphates.
- J. nat. Canc. Inst. 21, 532-539, (1958).
- Post coupling techniques of demonstration of alkaline phosphatase.
- J. nat. Canc. Inst. 24, 1199-1217, (1960).
- Histochemical demonstration of phosphatases in frozen section with naphthol AS-phosphates.
- J. Histochem Cytochem. 2, 146-153, (1961).
- Carpeneto, P.: Ricerche sperimentali sul "rene da sublimato".
- Pathologica (Genova) 32, 50-56, (1947).
- Eger, W.: Das Verhalten der Phosphoamidasen in der Leber bei Tetrachlorkohlenstoff- und Allylalkoholvergiftung.
- Virchows. Arch. 325, 648-656, (1954).
- Elbe, H.: Die Nieren- und Darmveränderungen bei der Sublimatvergiftung des Kaninchens und ihre Abhängigkeit vom Gefäßnervensystem.
- Virchows Arch. 182, 445-498, (1905).
- Gössner, W.: Untersuchungen über das Verhalten der Phosphatasen während der Autolyse.
- Virchows Arch. 327, 304-313, (1958).
- Gomori, G.: Microtechnical demonstration of phosphatases in tissue sections.
- Proc. Soc. exper. Biol.N.Y. 42, 23-26, (1939)
- Gössner, W.: Histochemischer Nachweis hydrolytischer Enzyme mit Hilfe der Azo-Farbstoff-Methoden.
- Histochemie 1, 48-96, (1958).
- Gomori, W.: Histochemical specificity of phosphatases.
- Proc. Soc. exper. Biol.Med. 70, 7-11, (1949)
- An improved histochemical technique for acid phosphatases.
- Stain. Technol. 25, 81-85, (1950).

alkaline phosphatase of cell nuclei.
J. Lab. a. Clin. Med. 37, 526-531, (1951).
The complex nature of alkaline phosphatase.
Biochem. Biophys. Acta. 8, 162-172, (1952).
Human esterases.
J. Lab. a. Clin. Med. 445-453, (1953).
Histochemistry of human esterases.
J. Histochem. Cytochem. 3, 479-481, (1955).
Histochemical methods for acid phosphatases.
J. Histochem. Cytochem. 4, 453-461, (1956).

Wroeg, D.; Rearse, A. G. E. :

A critical study of the histochemical methods
for acid phosphatase with a description of an
azo-dye method.
J. of Path. 64, 627-636, (1952).

Nauss, H. H.; Leppelmann, H. J. :

Über Änderungen von Fermentaktivitäten im Se-
rum als Ausdruck einer unspezifischen Reakti-
on des Organismus.
1 Mitt. Klin. Wschr. 35. Jahrg., 65-70, (1957).

Nauss, H. H.; Leppelmann, H. J. :

Über Änderungen von Fermentaktivitäten in der
Leber als Ausdruck einer unspezifischen Re-
aktion des Organismus.
11 Mitt. Klin. Wschr. 35. Jahrg., 71-74, (1957).

Hess, R.; Rearse, A. G. E. :

Enzyme immobilisation. Substantive diazonium
salts in enzyme histochemistry.
Enzymol. biol. clin. 1, 87-113, (1961/62).

Moif, R. :

Klinische Physiologie und Pathologie.
Georg Thieme Stuttgart (1962).

Meimann, J.; Nimes, H. D.; Klein, R.; Roulos, V.; Post, J. :

Responses of the liver to injury. Effect of
previous injury upon the healing pattern af-
ter acute tetrachloride poisoning.
Arch. of Path. 62, 96-102, (1956).

- Kay, H.D. : Plasma phosphatase. I. Method of determination.
J. biol. Chem. 89, 235-247, (1930).
- Kay, H.D. : Plasma phosphatase. II. The enzyme in disease, particularly in bone disease.
J. biol. Chem. 89, 249-269, (1930).
- Kritzler, R. A. : Microchemical variation of alkaline phosphatase of liver in obstructive and hepatocellular jaundice.
Amer. J. Path. 25, 1079-1103, (1949).
- Lapp, H.; Schafé, K. : Morphologische, histochemische und Speichungsuntersuchungen über den Verlauf der Sublimatnephrose bei der Ratte.
Beitr. Path. Anat. 123, 77-100, (1960).
- Leewy, C.M.; Hollister, R.M.; Schmid, R.; McDonald, R.A.; Davidson, Ch.S. : Liver regeneration in experimental carbontetrachloride poisoning.
Proc. Soc. exper. Biol. N.Y. 102, 672-675, (1959)
- Lojda, Z. : Über die quantitative Bestimmung der alkalischen Phosphatase und Aliesterase in histochemischen Schnitten mit einem modifizierten Azo-Kupplungsverfahren.
Acta Histochem. 5, 236-242, (1957).
- McCloskey, J.F.; McGehee, H. : Effect of subcutaneous and intraperitoneal administration of carbontetrachloride on the liver of the rat.
Arch. of Path. 46, 200-204, (1950).
- Menten, M.L.; Junge, J.; Green, M.H. : A coupling histochemical azo-dye test for alkaline phosphatase in the kidney.
J. biol. Chem. 153, 471-477, (1944).
- Myren, J. : Injury of the liver tissue in mice after a single injection of carbontetrachloride.
Acta path. Scand. (Köbenh) 116, 1-31, (1956).
- Noltenius, H.; Schelhas, H. : Biopsische und tierexperimentelle Untersuchungen zur histologischen Rückbildungen glomerulärer und tubulärer Nierenerkrankungen.
Med. Welt. 1963, 844-849.
- Pearse, A.G.E. : Histochemistry. J. A. A. Churchill Ltd. London (1960).

- Petzold, A.: Histochemische Untersuchungen an der mit Tetraachlokokohlenstoff geschädigten Rattenleber. *Acta biol. med. german.* 2, 7-12, (1958).
- Plenert, W.: Der histochemische Nachweis der alkalischen Phosphatase. *Acta Histochem.* 5, 79-88, (1957).
- Popper, H.; Schaffner, F.: Die Leber. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1961).
- Pugh, D., Walker, P.G.: The localisation of N-acetyl-glucose-amidase in tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 9, 242-250, (1961).
- Richterich, R.: Enzympathologie. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1958).
- Roberts, W.M.: Brit. med. J. zit. bei Richterich (1958).
- Robinson, R.: The probable significance of hexosephosphoric esters in ossification. *Biochem. J.* 17, 286-293, (1923).
- Rutenberg, A.M.; Seligman, A.M.: The histochemical demonstration of acid phosphatase by a post incubating coupling technique. *J. Histochem. Cytochem.* 3, 455-470, (1955).
- Sachs, H.W.; Dulskas, A.: Die alkalische Phosphatase der Niere bei einigen Vergiftungen. *Virchows Arch.* 329, 466-485, (1956).
- Seligman, A.M.; Manheimer, L.H.: A new method for the histochemical demonstration of acid phosphatase. *J. Nat. Canc. Inst.* 9, 427-434, (1949).
- Staemmler, M.: Die akuten Nephrosen. I. Mitt.: Die Sublimatnephrose. *Virchows Arch.* 328, 1-17, (1956).

- Stowell, R.E.; Lee, C.S.: Histochemical studies of mouse liver after single feeding of carbontetrachloride. Arch. of Path. 50, 511-537, (1950).
- Talageri, V.R.; Samarth, K.D.; Baxi, A.J.; Venkataraman, P.R.: Alkaline phosphatase levels in plasma and liver following carbontetrachloride administration. Brit. J. Exper. Path. 32, 118-123, (1951).
- Wahli, P.N.; Tandon, H.D.; Bharadwaj, T.P.: Acute carbontetrachloride injury. Part I. Histochemical studies. Acta path. Scand. (Köbenh.) 37, 305-314, (1955).
- Weiler, F.: Die anatomischen Veränderungen bei der Sublimatvergiftung in Abhängigkeit vom Gefäßnervensystem. Virchow Arch. 212, 200-224, (1913).
- Wächstein, M.; Zak, F.G.: Alkaline phosphatase in experimental biliary cirrhosis. Amer. J. clin. Path. 20, 99-115, (1953).
- Wächstein, M.: Histochemical staining reactions of the normally+ functioning and abnormal kidney. J. Histochem. Cytochem. 3, 246-270, (1955).
- Zimmermann, H.; Platt, D.: Über die Beeinflussbarkeit der histochemischen Darstellbarkeit oxydativer Enzyme durch Narkose. Frankfurt Z. Path. 71, 453-463, (1962).

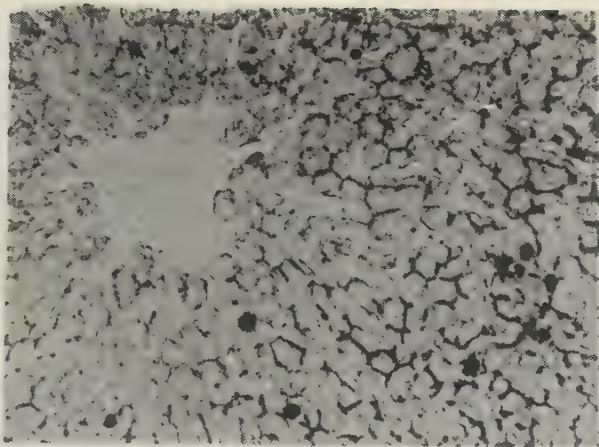


Abb.1 : Die alkalische Phosphatase der normalen Rattenleber
Geringe Aktivität in der Umgebung der Zentralvene.

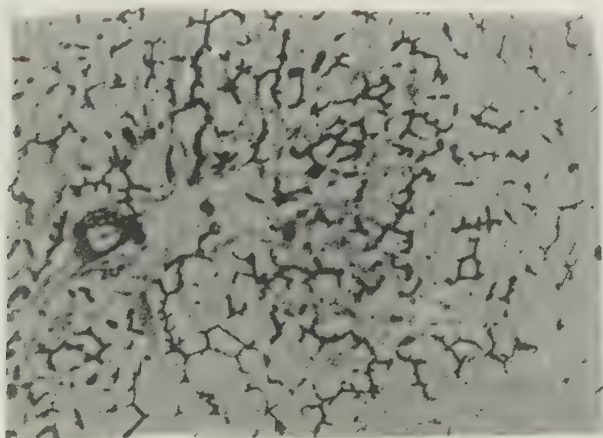


Abb.2 : Alkalische Phosphatase der normalen Rattenleber.
Starke Aktivität in der Umgebung eines Glissonschen Feldes.

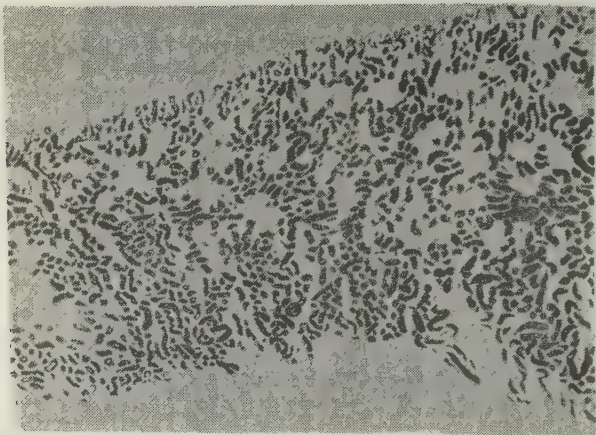


Abb.3 : Alkalische Phosphatase der normalen Rattenniere.
Positive Reaktion nur in der Rinde.

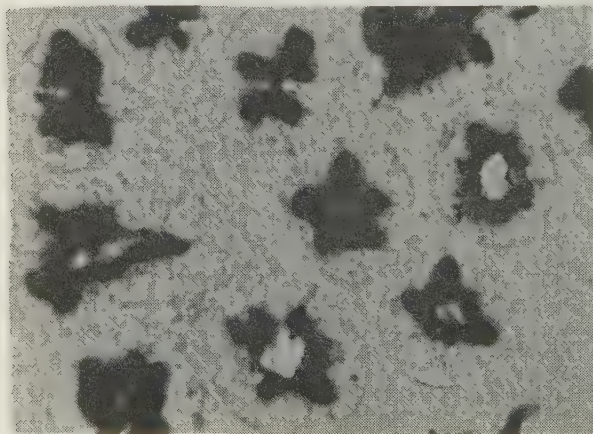


Abb.4 : Alkalische Phosphatase der normalen Rattenniere.
Tubulusquerschnitte.

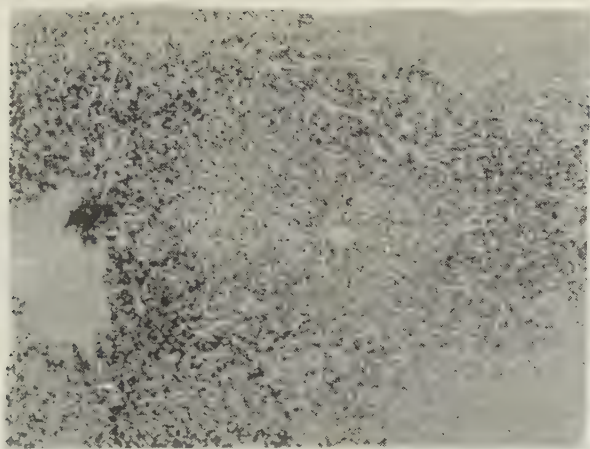


Abb.5 : Saure Phosphatase der normalen Rattenleber.
Starke Aktivität in der Leppchenperipherie.

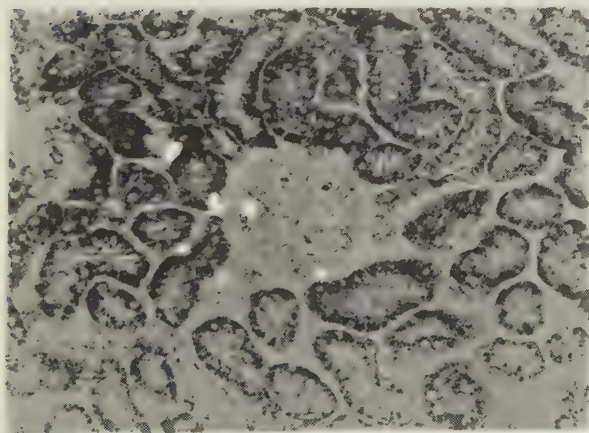


Abb.6 : Saure Phosphatase der normalen Rattenniere.

Alkalische Phosphatase der Leber

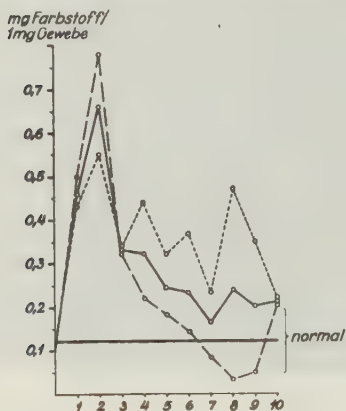


Abb. 7: Alkalische Phosphatase der Leber nach 1 - 10 CCl_4 -Begasungen (--- = 1. Versuchreihe; = 2. Versuchreihe; — = Zwischenwerte)

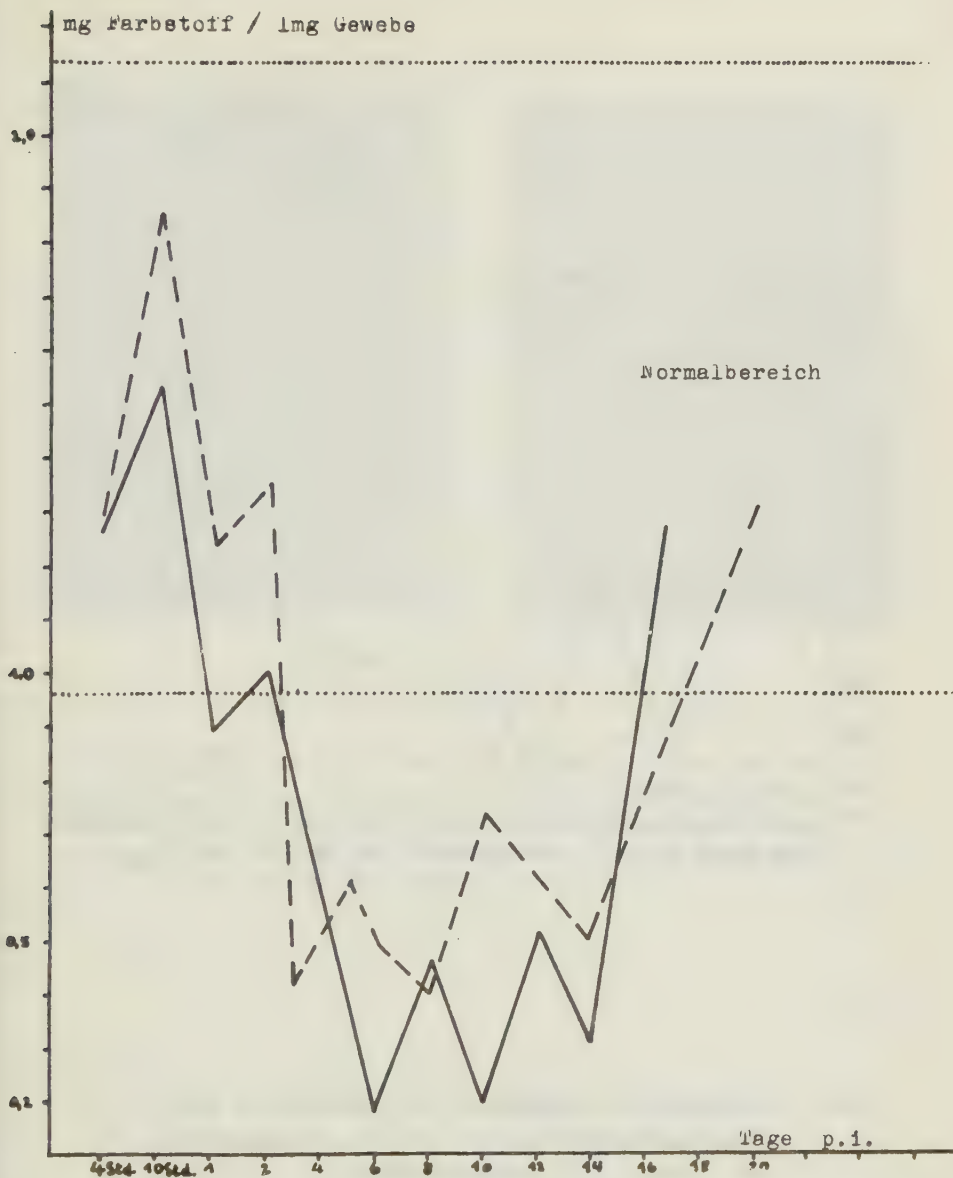


Abb. 8 : Alkalische Phosphatase der Niere nach Sublimatvergiftung ; (- - - = 1. Versuchsreihe ; — = 2. Versuchsreihe).

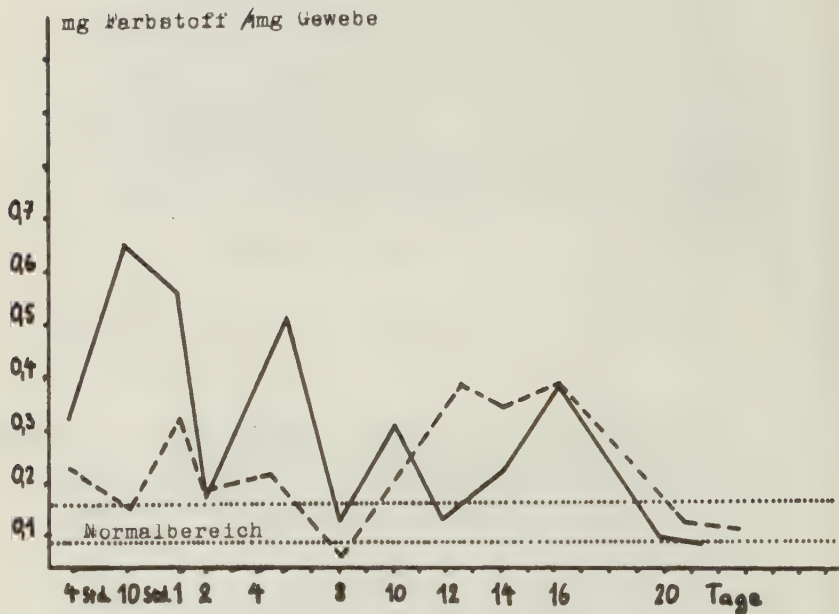
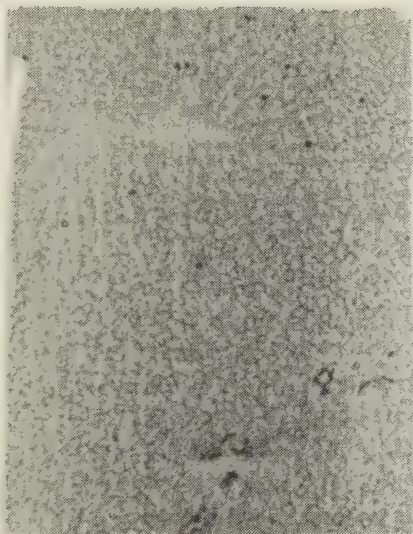


Abb. 9 : Alkalische Phosphatase der Rattenleber nach Sublimatvergiftung. (——= 1. Versuchreihe; ----- = 2. Versuchreihe).



a



b

Abb.10 : Alkalische Phosphatase der Leber. a = normale Leber,
b = Anstieg der alkalischen Phosphatase einen Tag nach
der Sublimatinjektion.

Lebenslauf.

Am 3. Juli 1938 wurde ich als Sohn des Dr. med. Otto Krey und seiner Frau Anneliese in Fulda geboren.

In meiner Geburtsstadt besuchte ich von 1945 - 1949 die Grundschule und von 1949 - 1958 das Realgymnasium. Im Sommer 1958 begann ich mit meinem Medizinstudium an der Universität Kiel. Im Wintersemester 1959/60 studierte ich an der Universität Sarrbrücken und beendete mein vorklinisches Studium im Sommer 1960 mit dem Physikum in Kiel. Im ersten klinischen Semester studierte ich in Wien und ging zum Sommersemester 1961 wieder nach Kiel. Seit dem Wintersemester 1961/62 bin ich in Frankfurt und beendete hier im Dezember 1963 mein Studium mit dem Staatsexamen. Seit März 1964 bin ich Medizinalassistent am Pathologischen Institut der Universität Frankfurt.

Frankfurt am Main, den 1. Oktober 1964

Hänke Krey
Hauke Krey

mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Zimmermann für die
Überlassung des Themas und seine hilfreiche Unterstützung so-
wie Herrn Prof. Dr. Taubmann, der mir freundlicherweise bei
den Tetrachlorkohlenstoff-Begasungsversuchen behilflich war.

Meine akademischen Lehrer waren:

Prof. Dr. med. Dr. phil. R. Ammon, Physiologische Chemie.
Prof. Dr. med. W. Artelt, Geschichte der Medizin.
Prof. Dr. med. H. Chiari, Pathologie.
Prof. Dr. med. W. Doerr, Pathologie.
Prof. Dr. med. H. Eufinger, Chirurgie.
Prof. Dr. med. H. Ferner, Anatomie.
Prof. Dr. med. K. Fellingner, Innere Medizin.
Prof. Dr. med. J. Frey, Innere Medizin.
Prof. Dr. med. R. Heinecker, Innere Medizin.
Prof. Dr. med. L. Heller, Frauenheilkunde.
Prof. Dr. med. F. Herrmann, Dermatologie.
Prof. Dr. med. K. Herzberg, Hygiene.
Priv. Doz. Dr. med. H. Hirsch, Chirurgie.
Prof. Dr. med. F. Hoff, Innere Medizin.
Prof. Dr. med. P. Holtz, Pharmakologie.
Prof. Dr. med. Dr. phil. E. Horstmann, Anatomie.
Prof. Dr. med. G. Kahiau, Pathologie.
Prof. Dr. med. O. Kaser, Frauenheilkunde.
Prof. Dr. med. Dr. phil. K.H. Knese, Anatomie.
Prof. Dr. med. W. Krücke, Pathologie des Centralnervensystems.
Prof. Dr. med. C. Kulenkampff, Neurologie und Psychiatrie.
Prof. Dr. med. A.v. Kügelgen, Anatomie.
Prof. Dr. med. H. Lapp, Pathologie.
Prof. Dr. G. Leonhardi, Dermatologie.
Prof. Dr. med. W.A. Lieb, Augenheilkunde.
Prof. Dr. med. E. Lullies, Physiologie.
Prof. Dr. med. K. Luff, Gerichtliche Medizin.
Prof. Dr. med. R. Mittermaier, Hals-Nasen-Ohren Heilkunde.
Prof. Dr. med. H. Netter, Physiologische Chemie.
Prof. Dr. med. R.v. Oppolzer, Chirurgie.
Prof. Dr. med. J.E. Otto, Augenheilkunde.
Prof. Dr. med. E. Philipp, Frauenheilkunde.
Prof. Dr. med. dent. J.v. Reckow, Zahnheilkunde.
Prof. Dr. med. H. Reinwein, Innere Medizin.
Prof. Dr. med. E. Rolshoven, Anatomie.

Prof. Dr. med. G. Rossberg, Hals-Nasen-Ohren Heilkunde.
Prof. Dr. med. B. de Rudder, Kinderheilkunde.
Prof. Dr. med. G. Audolph, Physiologie.
Prof. Dr. med. A.W. Schwenzer, Frauenheilkunde.
Prof. Dr. med. A. Stämpfli, Physiologie.
Prof. Dr. med. D. Starck, Anatomie.
Prof. Dr. med. F. Strnad, Röntgenologie.
Prof. Dr. med. R. Thiel, Augenheilkunde.
Prof. Dr. med. E. Ungeheuer, Chirurgie.
Prof. Dr. med. R. Wanke, Chirurgie.
Prof. Dr. med. W. Weber, Chirurgie.
Prof. Dr. med. K. Weisse, Kinderheilkunde.
Prof. Dr. med. H. Zimmermann, Pathologie.
Prof. Dr. med. J. Zutt, Neurologie und Psychiatrie.

Ehrenwörtliche Erklärung:

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die der Medizinischen Fakultät Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel "Histotopochemische und quantitativ histochemische Untersuchungen über das Verhalten der alkalischen und sauren Phosphatasen an der normalen und durch Tetrachlorkohlenstoff und Sublimat geschädigten Leber und Niere der Ratte" im Senckenbergischen Pathologischen Institut der Universität Frankfurt am Main unter Leitung von Prof. Dr. H. Zimmermann ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt am Main, den 15. September 1964

Hauke Krey

Hauke Krey

